

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Bases moleculares de actividad y resistencia de péptidos
membrano-activos en procariotas : comparación Leishmania
como modelo eucariota**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Rosario Fernández-Reyes Silvestre

DIRECTOR:

Luis Ignacio, dir Rivas-López

Madrid, 2015

T576.89:61
FER
bas
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



**BASES MOLECULARES DE ACTIVIDAD Y
RESISTENCIA DE PÉPTIDOS
MEMBRANO-ACTIVOS EN PROCARIOTAS.
COMPARACIÓN CON *Leishmania* COMO
MODELO EUUCARIOTA.**

Tesis Doctoral

María Del Rosario Fernández-Reyes Silvestre

Madrid, 2010



R139541289



A mi abuelo (in memoriam)

***Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar... es empezar a morir.***

Gregorio Marañón.

Agradecimientos.

Quisiera mostrar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas que durante estos años han participado y me han ayudado a la realización de este trabajo, comenzando por mi director de Tesis Luis Rivas, por su confianza, apoyo y la cantidad de tiempo dedicado a la realización del mismo.

También tengo mucho que agradecer a los compañeros de los servicios del CIB; Carmen Terrón, Miguel Ángel y Paco del servicio de proteómica; Lola y Carmen Terrón (repetimos) de microscopía electrónica; Mónica y Pablo de fotografía y por supuesto a Carmen de material, quienes me han aportado todos sus conocimientos con la mejor disponibilidad tanto profesional como personalmente.

A David Andreu de la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona y a todo su grupo, especialmente a Manu, Beatriz, Cristina y Carolina, con quienes hemos colaborado activamente durante todos estos años.

A José María Requena, Javier Carrión e Isra por su colaboración en el PETRI, que aunque no ha sido parte integrante de los resultados de este trabajo se ha desarrollado durante su elaboración, y sin ellos no habría salido adelante.

A Mari Luz por proporcionarme la base de las técnicas en mis inicios en proteómica, a Tere Suárez y Anne, por proporcionarnos los Dycis siempre a punto y por su entusiasta ayuda en el diseño de todos los experimentos.

A mis compañeros del día a día en el laboratorio, los que ya no están pero continúan echando una mano siempre que los necesito: Jose, Javier y Euge; los que han estado de paso y han dejado huella: Conchi, Neus, Peter, Silvia, Lodovica y Maiti; al de siempre: Luque; y los dos nuevos fichajes: Cris y Oscar. Muchas gracias a todos porque trabajar rodeada de buena gente hace que todo sea mucho más sencillo.

Y para buena gente la del laboratorio de los vecinos, con quienes compartimos mucho más que pasillo; Eduardo, Mariano, hasta hace nada Andrea y las chicas: Eunat, Eva, Leo y Mar, gracias por los buenos ratos y por recibirme siempre como una más del grupo y a Pilar Zaragoza, no hay palabras, has estado cerca desde el primer día, eres una fuera de serie, muchas gracias por todo tu cariño durante estos años. Hablando de Pilares, mil gracias a Pilar Fernández, la mejor cara del CIB sin duda, no hay un solo día en el que no pase por el laboratorio con la mejor de las sonrisas.

Siempre he pensado que la mayor ventaja de trabajar en el CIB es la suerte de tener tan cerca a muchas de mis amigas: Ana De Las Heras (no me digas que no te ha sorprendido, te he respetado el apellido) y Ana Alonso, siempre ha habido y siempre habrá algo que nos tengamos que contar... A Irenilla y Meri, chicas cómo os echo de

menos!!!. Entre todas ellas está mi “amigo misterioso” Abel, menos mal que te tenemos para poner orden de vez en cuando. A Yoli, que desde lejos se ha preocupado como la que más por el estado de mi Tesis, a Arianna, si no hubiese sido por tu ayuda todavía seguiría matando hámster en Majadahonda y a Euge, siempre nos quedarán las cañas para celebrar las cosas buenas.

Además ha habido otro montón de gente cerca dispuesta a echar un cable: Pedro, Miguel, Luis, Elena Sierra, Eli, Benet...

A mis amigas de la facultad: Cris, Meri, Eli, Marti y Piltri, es una gozada saber que pase lo que pase en “la reja” siempre tendremos una oportunidad para triunfar. A mi amiga de siempre Esther Valenciano y a mi amigo Oskikar.

A mi familia, para lo bueno y para lo malo somos lo que somos, UN MONTÓN, gracias por estar siempre ahí, a mi madre por tirar de los cinco y enseñarnos las cosas importantes de la vida, a mis hermanos por cuidarme y a mis cuñadas porque no podrían ser mejores, a mis sobrinos: Alfre, Eulo, Bal, María, Ramón, Alfredo, Anto, Miguel, Roque, Rodrigo y Alfonso por ser geniales. Y al Atleti porque este año nos ha dado una alegría.

Finalmente a Iker, muchas gracias por haber estado conmigo, haberme apoyado y ayudado mucho más de lo que puedes imaginar, debería existir el título de Doctores consortes. Otra cosa hecha que ya podemos marcar de las cosas por hacer...

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Péptidos antibióticos.	1
1.1.1. Péptidos antibióticos de origen procariota.	2
1.1.1.1. Gramicidina S.	3
1.1.1.2. Polimixinas.	6
1.1.2. Péptidos antibióticos de origen eucariota.	12
1.1.2.1. Clasificación.	12
1.1.2.2. Mecanismo de acción.	12
1.1.2.3. Síntesis química y modificaciones.	16
1.1.2.4. Ventajas de su uso frente a antibióticos convencionales.	18
1.1.2.5. Péptidos híbridos cecropina A-melitina.	19
1.1.2.6. LL-37.	20
1.2. Patógenos diana de los péptidos objeto del presente estudio.	23
1.2.1. <i>Leishmania</i> y leishmaniasis.	23
1.2.1.1. Taxonomía del género.	24
1.2.1.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad.	24
1.2.1.3. Ciclo biológico del parásito.	27
1.2.1.4. Características morfológicas y moleculares de <i>Leishmania</i> .	29
1.2.1.5. Mecanismos de evasión.	32
1.2.1.6. Control de la enfermedad.	33
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>.	37
1.2.2.1. Características microbiológicas.	37
1.2.2.2. Epidemiología.	37
1.2.2.3. Resistencia a antibióticos.	38
1.2.2.3. Patogenia y factores de virulencia.	40
1.2.2.4. Vacunas.	44
1.2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>.	44
1.2.3.1. Características microbiológicas.	44
1.2.3.2. Epidemiología.	45
1.2.3.3. Resistencia a antibióticos en <i>Acinetobacter baumannii</i> .	46
1.2.3.4. Patogenicidad y virulencia.	47
1.2.3.5. Alternativas terapéuticas en el tratamiento de cepas multirresistentes.	50

2. OBJETIVOS.	55
3. MATERIAL Y MÉTODOS,	59
3.1. Medios de cultivo, reactivos, equipos y material de laboratorio.	61
3.2. Cultivo de células.	62
3.3. Generación in vitro de la cepa resistente a colistina de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	63
3.4. Actividad leishmanicida de péptidos antibióticos.	63
3.5. Actividad bactericida de péptidos antibióticos.	65
3.6. Citotoxicidad de péptidos antibióticos.	65
3.7. Parámetros de actividad e índice terapéutico de de péptidos antibióticos.	66
3.8. Actividad de de péptidos antibióticos sobre la membrana del patógeno.	66
3.9. Eficiencia biológica de <i>A. baumannii</i> (<i>fitness</i>) cepas sensible y resistente a colistina y caracterización del fenotipo resistente.	69
3.10. Proteómica diferencial de <i>A. baumannii</i> .	73
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	81
4.1. Análogos de CA(1-7)M(2-9) con ϵ-N,N,N trimetil lisinas.	81
4.1.1. Introducción.	81
4.1.2. Resultados.	83
4.1.3. Discusión.	105
4.2. Análogos de GS con derivados de fenilalanina y su actividad biológica.	111
4.2.1. Introducción.	111
4.2.2. Resultados.	112
4.2.3. Discusión.	133
4.3. Actividad de péptidos lineales cecropina A-melitina y catelicidina humana LL-37 sobre cepas de comunidad de <i>S. aureus</i>.	139
4.3.1. Introducción.	139
4.3.2. Resultados.	141
4.3.3. Discusión.	150
4.4. <i>Acinetobacter baumannii</i>; proteómica diferencial entre cepas sensible y resistente a colistina. Caracterización del fenotipo resistente.	153
4.4.1. Introducción.	153
4.4.2. Resultados.	155
4.4.3. Discusión.	169
4.4.4. Material suplementario.	177
5. DISCUSIÓN GENERAL.	187
6. CONCLUSIONES.	199
7. BIBLIOGRAFÍA.	203

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Ácido lipoteicoico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (<i>american type culture collection</i>)
BGN	Bacilos Gram-negativos
BSA	Seroalbúmina bovina
CDC	Centro para el control de enfermedades (<i>centers for diseases control</i>)
CECT	Colección española de cultivos tipo
CLSI	Centro de referencia para clínica y laboratorio (<i>clinical and laboratory standards institute</i>)
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DDSA	Anhídrido dodecenil succínico
DIGE	Electroforesis diferencial en gel (<i>difference gel electrophoresis</i>)
DMP-30	2,4,6-Tri(dimetilamino-metil)fenol
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonil
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GS	Gramicidina S
GD	Gramicidina D
HC	Concentración hemolítica
HMP	Proteína modificable por calor (<i>heat modifiable protein</i>)
IL	Interleucina
IT	Índice terapéutico
LB	Medio de Luria Bertani
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacárido
LPV	Leucocidina de Panton-Valentine
ME	Membrana externa
MH	Medio Mueller-Hinton II equilibrado en cationes
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex</i>)
MI	Membrana interna
MNA	Anhídrido metil náxico
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud

Oxp	Óxido de propileno
PA	Péptido antibiótico
PAE	Péptido antibiótico eucariótico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBS	Tampón fosfato salino
PPG	Proteofosfoglicanos
PXB	Polimixina B
PXE	Polimixina E / colistina
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
SAR	Relación estructura-actividad (<i>structure activity relationship</i>)
SARM	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFBI	Suero fetal bovino inactivado
TBP	Tributilfosfina
TFE	Trifluoroetanol
TLR	Receptor tipo toll (<i>toll like receptor</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral (<i>tumor-necrosis factor α</i>)
TX-100	Triton X-100
UFC	Unidad formadora de colonia
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> de resistencia intermedia a vancomicina
VRE	Enterococo resistente a vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS.

El descubrimiento de la penicilina y posterior expansión de su distribución a mediados de los años 40, supuso un gran hito en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, que inició junto con el desarrollo de nuevas moléculas la denominada edad de oro de los antibióticos. En contraposición, el uso masivo de los mismos produjo una importante selección bacteriana y la progresiva aparición de resistencias, con constante reducción del número de antibióticos eficaces disponibles. En los últimos 40 años las estrategias de creación de nuevos antimicrobianos se han basado en modificaciones estructurales de antibióticos preexistentes o en terapias de combinación de fármacos, quedando en un segundo plano la identificación de nuevas moléculas (Oyston *et al.*, 2009), reducidas a 4 nuevas familias de antibióticos, esencialmente contra bacterias Gram-positivas (Marr *et al.*, 2006): lipopéptidos (Pirri *et al.*, 2009), oxazolidinonas (Vara Prasad, 2007), estreptograminas (Aksoy y Unal, 2008) y tigeciclinas, esta última activa además contra bacilos Gram. negativos (BGN) (Bhattacharya *et al.*, 2009). En consecuencia, la alarmante aparición de resistencias a los antibióticos clásicos de las últimas décadas, determina que la generación de nuevas moléculas microbicidas sea un constante reto en investigación.

Los péptidos antimicrobianos (PAs) activos en membrana representan una nueva familia de antibióticos. Poseen actividad sobre un amplio número de microorganismos, incluidos bacterias, protozoos, hongos y virus; adicionalmente pueden actuar como moduladores del sistema inmune. (Jenssen *et al.*, 2006; Scott y Hancock, 2000). Su distribución filogenética es muy amplia; han sido aislados desde microorganismos unicelulares, insectos y plantas hasta vertebrados superiores, incluidos mamíferos (Hancock y Lehrer, 1998; Jenssen *et al.*, 2006). En los últimos 20 años se han descrito alrededor de 1500 péptidos antimicrobianos (Wang *et al.*, 2009). A pesar de su diversidad de secuencia y estructura secundaria, la mayoría de ellos comparten un tamaño entre 12 y 100 aminoácidos, alto porcentaje de residuos catiónicos (carga global entre +2 y +9) y un marcado carácter anfipático. Su mecanismo de acción se basa en el reconocimiento de la composición de fosfolípidos de membrana del patógeno y su posterior permeabilización. Por la universalidad de la membrana como estructura biológica, la especificidad de reconocimiento péptido-membrana se basa en las diferencias en composición lipídica de la misma, así como su distribución asimétrica; los procariotas y eucariotas inferiores poseen un mayor porcentaje en

Introducción

fosfolípidos aniónicos, que están expuestos al exterior, y por tanto accesibles a la interacción electrostática con el péptido. Por el contrario, las células de eucariotas superiores poseen menor porcentaje de fosfolípidos aniónicos y confinados en la cara citoplásmica de la membrana, inaccesibles para su interacción con PAs (Jenssen *et al.*, 2006). En la tabla I.1 se compara la composición fosfolipídica de la membrana del eritrocito, con la de un eucariota inferior (*Leishmania donovani*) y dos procariotas, representativos de un microorganismo Gram-negativo (*Pseudomonas aeruginosa*) y un Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*).

Tabla I.1. Composición de fosfolípidos en eritrocitos de mamífero, promastigotes de *L. donovani*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*

CL	-	0.6	11.0	42.0
PG	-	Trazas	21.0	58.0
PE	22.8	37.7	60.0	-
PC	27.1	14.9	-	-
PI	1.4	17.9	-	-
PS	14.2	9.9	-	-
PA	1.4	Trazas	-	-
Otros	33.1	19.0	-	-

CL= Cardiolipina. PG= Fosfatidilglicerol. PE= Fosfatidiletanolamina. PC= Fosfatidilcolina. PI= Fosfatidilinositol. PS= Fosfatidilserina. PA= Ácido fosfatídico. (Epand *et al.*, 2007; Wassef *et al.*, 1985).

Conforme a su origen, se diferencian 2 grupos principales péptidos antibióticos: i) de origen procariota, cuyas dianas de acción son otros microorganismos, generalmente otras bacterias competidoras en el mismo nicho ecológico, y ii) de origen eucariota o PAEs, presentes en todos los organismos eucariotas superiores y cuya función principal es la de defensa frente a la infección por un patógeno (Hancock y Chapple, 1999).

1.1.1. PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS DE ORIGEN PROCARIOTA.

Los péptidos antibióticos de origen procariota son sintetizados tanto por bacterias Gram-negativas como por Gram-positivas, y secretados al medio donde ejercen una actividad antibiótica sobre bacterias diferentes a la cepa productora. Pueden ser clasificados en dos grupos:

Introducción

i) Péptidos **codificados por ADN y sintetizados por el ribosoma**. El ejemplo más documentado son las bacteriocinas, de tamaño muy variable, desde 19 residuos hasta masas moleculares superiores a 90KDa; frecuentemente presentan aminoácidos modificados, siendo el más frecuente lantionina. Pueden ejercer sus funciones bactericidas mediante inhibición de actividades enzimáticas, como la microcina C7 de *Escherichia coli*, la cual inhibe la síntesis de proteínas, la mersacidina de *Lactococcus* que inhibe la síntesis de peptidoglicano o la nisina de *Streptococcus lactis* que bien actúa mediante inhibición de la síntesis de pared por unión al lípido II o, a mayor concentración, por permeabilización de membrana plasmática (de Kruijff *et al.*, 2008; Hancock y Chapple, 1999; Sang y Blecha, 2008).

ii) Péptidos **no codificados por ADN y sintetizados extrarribosomalmente**. Gramicidinas, bacitracina, tirocidina, y polimixinas son algunos ejemplos de péptidos pertenecientes a este grupo. Este tipo de péptidos son sintetizados por complejos multienzimáticos con funcionalidad para reconocer cada residuo, activarlo, modificarlo si procede, e incorporarlo al polipéptido. Los péptidos finales con frecuencia son ricos en residuos modificados (hidroxi-, L-, D-, o aminoácidos poco comunes), que a su vez pueden sufrir posteriores modificaciones por N-metilación, acilación o formación de anillos heterocíclicos (Hancock y Chapple, 1999).

1.1.1.1. Gramicidina S.

El grupo de Dubos aisló y caracterizó la acción bactericida de varios polipéptidos lineales (gramicidinas A-D) y varios cíclicos (tirocidinas A-C) a partir de cultivos de *Bacillus brevis* (Dubos y Hotchkiss, 1941) sólo una década posterior al descubrimiento de la penicilina. Cuatro años después se aisló la gramicidina S (GS, gramicidina soviética), obtenida de cultivos de *B. brevis* encontrados en suelo ruso (Gause y Brazhnikova, 1944), y cuya efectividad fue demostrada sobre bacterias Gram-positivas y ciertas Gram-negativas (Izumiya *et al.*, 1979).

La GS es un decapeptido cíclico compuesto por dos pentapéptidos unidos cabeza-cola [ciclo-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂]. El modelo (Fig. 1.1) propuesto por Hodgkin-Oughton en 1957, propone una estructura en lámina β de dos cadenas antiparalelas, estabilizada mediante cuatro enlaces de hidrógeno entre los residuos de Leu y Val pertenecientes a hebras distintas, unidas por dos giros β de tipo II', donde los residuos de D-Phe y Pro ocupan las posiciones $i+1$ e $i+2$ respectivamente, que contribuyen a la estabilización de la lámina β (Schmidt *et al.*, 1957).

Introducción

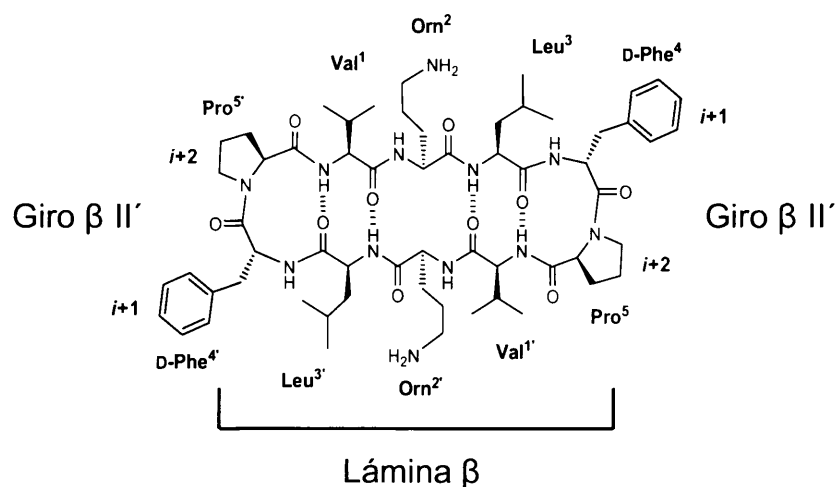


Figura I.1. Estructura propuesta para la gramicidina S, los enlaces de hidrógeno se indican con líneas discontinuas.

De acuerdo a su estructura cristalográfica (Hull *et al.*, 1978), las cadenas laterales hidrófobas de Val y Leu forman una de las caras de la molécula, mientras que las hidrófilas (residuos de Orn) constituyen la opuesta de carácter catiónico.

El pequeño tamaño de GS facilita su síntesis e implementación como antibiótico, ayudado por su amplio espectro de acción; es activa principalmente sobre bacterias Gram-positivas, y sobre ciertas Gram-negativas y hongos patógenos (Kondejewski *et al.*, 1996a; Kondejewski *et al.*, 1996b). Su forma cíclica y la presencia de aminoácidos de configuración D determinan que GS sea muy resistente a la proteólisis, con alta estabilidad *in vivo*. Por otro lado, la inducción de resistencias frente a la misma es baja. Su mecanismo de acción no ha sido completamente elucidado (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2008), aunque en su acción letal es clara la desestabilización de la membrana celular del patógeno, causando permeabilización irreversible (Katsu *et al.*, 1986). Desafortunadamente, el índice terapéutico de GS es bajo, con pobre selectividad entre microorganismos y células de mamífero, lo que limita su uso a aplicaciones tópicas (Prenner *et al.*, 1999). Como consecuencia, la mejora de su especificidad ha sido un objetivo constante en el desarrollo de nuevos análogos. Las estrategias han sido múltiples, abordando la modificación de su lámina β (Afonin *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 1991), de los giros β (Grotenbreg *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2005; Lee y Hodges, 2003), o incluso, de manera más drástica, el tamaño de su ciclo (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2009), así como formas diastereoméricas (Lee *et al.*, 2004). En la tabla I.2 se resumen algunas de las estrategias de modificación de GS.

Introducción

Tabla I.2. Ejemplos representativos de estrategias de modificación de GS.

Lámina β	Sustitución Orn (2,2') por Lys o Dbu	Disminución de actividad biológica	(Waki <i>et al.</i> , 1967)
	Acilación de grupos -NH ₂ de Orn (2,2') con diferentes ácidos orgánicos	Disminución de actividad microbicida	(Nagamurthi y Rambhav, 1985)
	Trimetilación de la cadena lateral de Orn (2,2')	Mantenimiento de actividad microbicida	(Kawai <i>et al.</i> , 1991)
	Sustitución de Val (1,1') y Leu (3,3') por 4F-Phg	Mantenimiento de actividad en membranas biológicas	(Afonin <i>et al.</i> , 2003)
	Sustitución de Val (1,1') o Leu (3,3') por Gly o por Ala.	Pérdida (Gly) o disminución (Ala) de actividad biológica.	(Kondo y Izumiya, 1967)
	Permutación de residuos (Val por Leu) y (Orn por Lys)	Variación en su actividad biológica	(Ando <i>et al.</i> , 1993)
	Aumento del tamaño del ciclo por adición de D-Lys (6, 6')	Incremento de actividad microbicida	(Tamaki <i>et al.</i> , 2008)
	Aumento del tamaño del ciclo por adición de Leu (2, 2')	Incremento de actividad microbicida. Pérdida de afipaticidad	
Giro β	Sustitución de D-Phe por análogos de Phe.	Mantenimiento de actividad microbicida y estructura en lámina β	(Yamada <i>et al.</i> , 2006)
	Sustitución de D-Phe por D-Trp	Incremento de toxicidad y reducción de actividad microbicida	(Jelokhani-Niaraki <i>et al.</i> , 2008)
	Sustitución de Pro por γ -aminoprolina con un grupo catiónico adicional.	Desestabilización de la lámina β y reducción de actividad microbicida.	(Kawai <i>et al.</i> , 2003; Kawai <i>et al.</i> , 2005)
	Sustitución de Pro por D-Pro	Desestabilización de la lámina β y reducción de actividad microbicida.	(Sato <i>et al.</i> , 1986)
	Inversión de secuencia D-Phe-Pro por Pro- D-Phe	Desestabilización de la lámina β y reducción de actividad microbicida.	(Tamaki <i>et al.</i> , 1985)
Lámina β Y Giro β simultáneas	Sustitución Orn por Lys y D-Phe por D-Tyr (análogo GS10) y posterior formación de diastereómeros.	Disociación de actividad microbicida y hemolítica	(Jelokhani-Niaraki <i>et al.</i> , 2000)
	Aumento del tamaño del ciclo por adición de: Lys y D-Tyr (análogo GS14) y análogos del mismo.	Disociación de actividad microbicida y hemolítica	(Lee y Hodges, 2003)
	Diastereómeros de GS14 y análogos	Disociación de actividad microbicida y hemolítica	(Abraham <i>et al.</i> , 2007)

DAB= Diaminobutírico, 4F-Phg= 4-fluorofenilglicina,

Introducción

Gracias a los estudios estructura-actividad (SAR) obtenidos tanto en membranas modelo como en sistemas microbiológicos, se han determinado los requisitos mínimos para su actividad biológica (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2008; Prenner *et al.*, 1999), resumidos en: i) naturaleza catiónica (Katsu *et al.*, 1986; Yamada *et al.*, 2006) ii) anfipaticidad, donde los residuos hidrófilos e hidrófobos se orientan en caras opuestas (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2000; Kondejewski *et al.*, 1999), iii) presencia de lámina β (Abraham *et al.*, 2007; Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2006), y iv) cierta hidrofobicidad global (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2000; Kondejewski *et al.*, 1999), conseguida por los residuos hidrofóbicos de la lámina β más D-Phe del giro β , cuya aromaticidad es importante para la actividad (Grotenbreg *et al.*, 2006; Grotenbreg *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006).

1.1.1.2. Polimixinas.

Al igual que la gramicidina S, las polimixinas son un grupo de péptidos cíclicos, catiónicos y anfipáticos que poseen actividad antibiótica frente a un amplio número de microorganismos. A diferencia de GS, son esencialmente activas frente a Gram-negativas (Mogi y Kita, 2009). Fueron descubiertas a finales de los años cuarenta, y son sintetizadas por diversas subespecies de *Bacillus polymyxa*. Existen cinco tipos diferentes de polimixinas (A-E), de las cuales sólo la polimixina B (PXB) y E (PXE o colistina) tienen uso en la práctica clínica.

Las polimixinas fueron comercializadas en los 50 y 60, pero su uso fue abandonado a consecuencia de sus efectos citotóxicos y al desarrollo de nuevos antibióticos de más amplio espectro y menos nocivos. Sin embargo, la aparición de bacterias resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles, ha causado actualmente un resurgimiento de su uso, por su actividad sobre la mayoría de estas cepas multirresistentes (Falagas y Kasiakou, 2005; Molina *et al.*, 2009). La polimixina B y colistina comparten la presencia de un heptapéptido cíclico con aminoácidos D, unido a un tripéptido, cuyo extremo N-terminal está acilado con un ácido graso (Fig. 1.2). La única diferencia entre ambas es la sustitución de D-Phe de PXB por D-Leu en la colistina. Dependiendo del tipo de ácido graso presente en la molécula se diferencian dos tipos de polimixina B (B1 y B2) y colistina (A y B), presentes en proporciones variables en las formulaciones farmacéuticas (Mogi y Kita, 2009).

Introducción

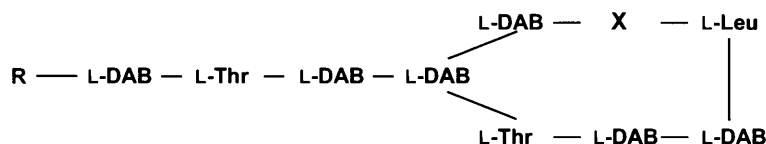


Figura 1.2. Estructura de polimixina B (X: D-Phe) y colistina (X: D-Leu). DAB: ácido diaminobutírico. R= ácido graso: 6-metiloctanoil (PXB1 y colistina) y 6-metilheptanoil (PXB2 y colistina B).

La colistina se comercializa como forma sulfato, muy potente y tóxico, restringido a aplicaciones tópicas y orales, y como metanosulfonato, de menor toxicidad dado que actúa como pro-fármaco, y empleado en administración parenteral y nebulizada. PXB comercializada únicamente como sulfato es utilizada en España exclusivamente para aplicaciones tópicas (Landman *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2009).

Las polimixinas son prácticamente inactivas frente a microorganismos Gram-positivos, pero son altamente activas frente a la mayoría de bacterias Gram-negativas, especialmente frente a bacilos BGNs aerobios (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsella* spp., *Enterobacter* spp, etc...), incluyendo aislados multirresistentes a otros antibióticos. Sin embargo, *Proteus mirabilis* y *Neisseria meningitis* poseen resistencia natural a PXB.

Recientemente se ha descrito que cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *K. pneumoniae*, teóricamente sensibles a polimixinas, presentan subpoblaciones con resistencia intrínseca e independiente de una exposición previa a dicho antibiótico, probablemente debido a la masificación de su uso. Estas subpoblaciones, muy minoritarias, son prácticamente indetectables por test de diluciones seriadas, pero su expansión preferencial en presencia de polimixina supone el fracaso terapéutico (Owen *et al.*, 2007; Poudyal *et al.*, 2008). Como era esperable, el origen de su resistencia radica en la modificación de la membrana externa, su diana terapéutica. Por su interés en el presente estudio, se describe someramente el lipopolisacárido, como componente principal de la misma (A), así como su papel en la resistencia a polimixinas (B y C).

Introducción

A) Lipopolisacárido bacteriano.

Las bacterias Gram-negativas disponen de una membrana adicional a la citoplásmica o membrana interna, denominada membrana externa (ME). Es extremadamente asimétrica en su composición lipídica; mientras su cara interna está compuesta por fosfolípidos, en la externa el **lipopolisacárido (LPS)** es su componente mayoritario. El LPS, fuertemente aniónico, posee tres regiones diferenciadas: **i) el lípido A**, muy conservado entre los diferentes tipos de bacterias, cuya región hidrofóbica sirve de anclaje a la ME y tiene un papel esencial en la funcionalidad de la misma; **ii) Núcleo** o región central, es una región oligosacáridica variable unida al lípido A mediante moléculas de ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (kdo), cuyo número es variable entre especies de bacterias; y finalmente, **iii) la cadena O específica**, es una cadena polisacáridica con alta variación en su composición y en el número de residuos. (Fig. I.3) (Gutsmann y Seydel, 2010). La ME actúa como primera barrera selectiva a la acción de los péptidos antibióticos, ya que precisan atravesarla para alcanzar la membrana interna. En consecuencia modificaciones del LPS son factores esenciales en la susceptibilidad de la bacteria frente a PAs (Rosenfeld y Shai, 2006).

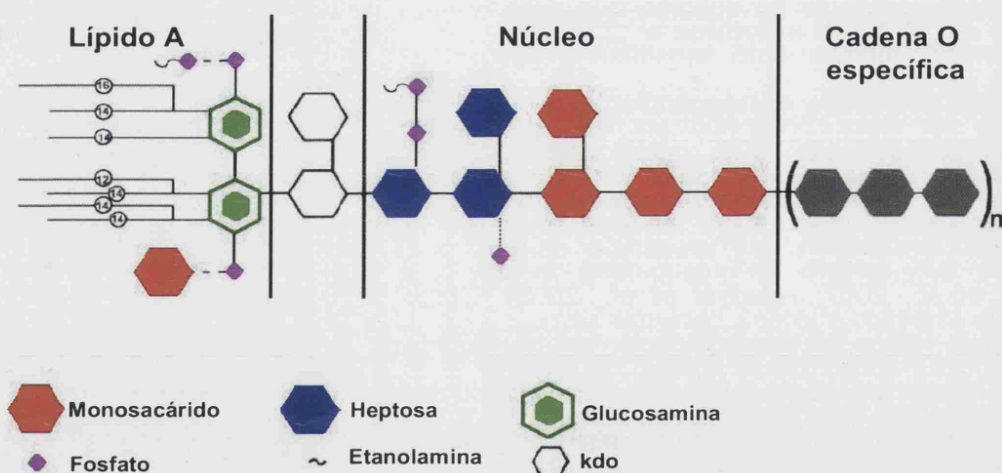


Figura I.3. Representación esquemática del LPS bacteriano de *Salmonella enterica*. Modificado de Gutsmann M y Seydel U. (2010)

B) Mecanismos de resistencia a polimixinas.

El carácter catiónico y anfipático de las polimixinas determina su mecanismo de acción. Las polimixinas desplazan los cationes divalentes, esencialmente Mg^{2+} , que entrecruzan las moléculas de LPS vecinas, desestabilizando la ME con permeabilización de la misma (Kwa *et al.*, 2008). La etapa final de su mecanismo de acción letal no es bien conocida; aunque puede interaccionar con los fosfolípidos aniónicos de la membrana interna e incluso permeabilizarla, gracias a su carácter catiónico y anfipático, lo hace a concentraciones muy superiores a la letal (Daugelavicius *et al.*, 2000). PXB induce estrés osmótico en *Escherichia coli*, se sitúa entre las caras periplásmicas de la MI y ME, promoviendo intercambio de fosfolípidos aniónicos entre ambas, alterando su simetría y provocando cambios metabólicos que conducen a la estasis bacteriana (Liechty *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000).

Las resistencias a las polimixinas se pueden agrupar bajo cuatro grandes epígrafes: **i) modificaciones específicas del LPS**, en general con disminución de su carácter aniónico, mediante esterificación de los grupos fosfatos del lípido A o de la región central con etanolamina (EtN) o 4-amino-L-arabinosa (Ara4N) (véase fig. I.3). En este tipo de modificaciones esta mediada por los sistemas de dos componentes bacterianos, descritos en detalle en el siguiente apartado; **ii) presencia de cápsula polisacarídica** que impide o dificulta el acceso del PA a las membranas bacterianas; **iii) activación de bombas de expulsión** de amplio espectro, y **iv) presencia de porinas** que modulan la permeabilidad y arquitectura de ME, resumidos sucintamente en la tabla I. 3.

Introducción

Tabla I. 3. Ejemplos representativos de resistencia a PXs en bacterias.

Mecanismo de resistencia		Gen / Proteína	Especie	Tipo de Resistencia	FR*	Referencia
Cápsula externa		Operón <i>cps</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	N / C	2	(Spinosa <i>et al.</i> , 2007)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I / C	3	(Campos <i>et al.</i> , 2004)
Modificación LPS	Incorporación de Ara4N	RppAB	<i>Proteus mirabilis</i>	N / C	160	(Wang <i>et al.</i> , 2008b)
		PhoPQ / PmrAB	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	I / L	30	(Gunn, 2008; Sun <i>et al.</i> , 2009)
		PhoPQ / PmrAB	<i>Escherichia coli</i>	I / C	10	(Breazeale <i>et al.</i> , 2005; Moon y Gottesman, 2009)
		Wzc/ EtK				(Lacour <i>et al.</i> , 2008)
		PhoPQ / PmrAB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I / C	16	(Barrow y Kwon, 2009)
		PhoPQ / PmrAB	<i>Yersinia pestis</i>	I / L	100	(Felek <i>et al.</i> , 2009)
	Incorporación de EtN	LptA	<i>Neisseria meningitidis</i>	N / C	256	(Tzeng <i>et al.</i> , 2005)
		PhoPQ / PmrAB	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	I / L	30	(Gunn, 2008; Sun <i>et al.</i> , 2009)
		PmrAB	<i>Acinetobacter baumannii</i>	I / C y L	128	(Adams <i>et al.</i> , 2009)
	Deacilación / Palmitoilación	Pag L	<i>Salmonella enterica</i>	I / L	3	(Kawasaki <i>et al.</i> , 2007)
		Pag P				
Porinas / Bombas de expulsión / Proteínas de ME		Omp A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I / C	2.5	(Llobet <i>et al.</i> , 2009; Llobet <i>et al.</i> , 2008)
		Omp U	<i>Vibrio cholerae</i>	I / L	100	(Mathur <i>et al.</i> , 2007a; Mathur y Waldor, 2004)
		Proteína ME H1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I / L	2	(Moore <i>et al.</i> , 1984)
		OprH			8	(Macfarlane <i>et al.</i> , 1999)
		Por B	<i>Neisseria meningitidis</i>	N / C	256	(Tzeng <i>et al.</i> , 2005)
		Mtr				

Ara4N =4-amino-4-deoxi-L-arabininosa. pEtN=Fosfoetanolamina. Tipo de resistencia; I= Inducida, N= Natural.

Aislamiento; C= Clínico, L= Laboratorio. *FR= Factor de resistencia.

C) Sistemas de dos componentes.

Los sistemas de dos componentes se componen de una histidina quinasa (HK) unida a la MI y de un regulador de respuesta (RR) citoplásmico (Gao y Stock, 2009; Mascher *et al.*, 2006). La HK normalmente posee un dominio externo (localizado en el espacio periplásmico de las bacterias Gram-negativas) que actúa como sensor del medio. La detección de una señal (cambio de pH, variación de la concentración de Ca^{2+} o Mg^{2+} , péptidos antibióticos) provoca un cambio conformacional del dominio intracelular y autofosforilación de una histidina de la HK, este grupo fosfato es transferido a un aspártico de la región N-terminal del RR, activándolo para su unión a la región promotora de genes reguladores. Los sistemas de dos componentes implicados en la resistencia a polimixina son PhoP-PhoQ (PhoPQ) y PmrA-PmrB (PmrAB). Dichos sistemas se activan *in vitro* mediante pH ácido o en presencia de determinados péptidos antimicrobianos, y se reprime con concentraciones milimolares de Ca^{2+} o Mg^{2+} . En algunas bacterias como *Salmonella spp.* ambos sistemas interaccionan a través de una proteína denominada PmrD, donde PmrAB puede ser activado por un estímulo directamente, o indirectamente por PhoPQ (Bader *et al.*, 2003; Gunn, 2008). La figura I. 4 esquematiza el mecanismo de activación e interacción de estos sistemas de dos componentes.

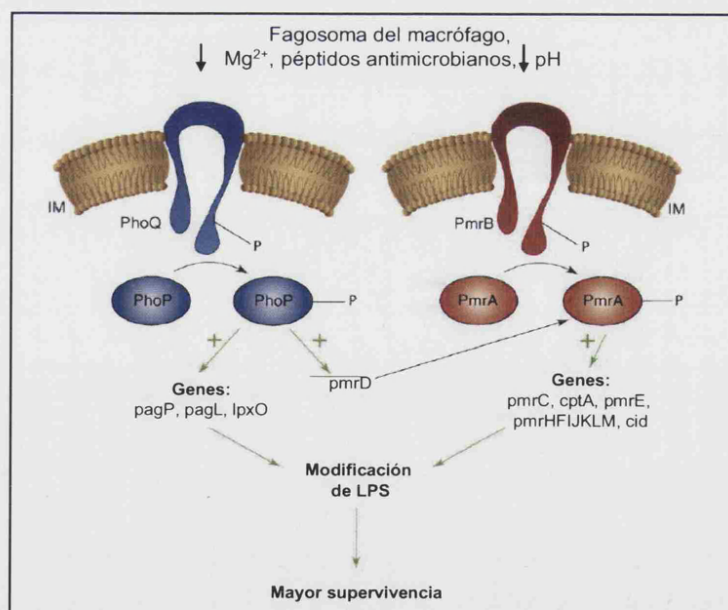


Figura I.4. Modelo de activación e interacción de PhoPQ y PmrAB en *Salmonella spp.* PmrAB puede ser activado directamente, o indirectamente a través de pmrD. La fosforilación de PhoP y PmrA implica un aumento de los niveles de transcripción de diferentes genes implicados en las distintas modificaciones del LPS. Esquema modificado de Gunn J.S. (2008).

Introducción

1.1.2. PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS EUCARIÓTICOS (PAEs).

El origen de los PAEs es múltiple, y obedece a su función de defensa inmediata en todos los organismos pluricelulares. Como tal, son esenciales en organismos carentes o con débil desarrollo de inmunidad antígeno específica, como plantas (García-Olmedo *et al.*, 1998) e invertebrados (Jenssen *et al.*, 2006). Al tratarse de un sistema altamente eficaz y económico en el número de genes, comparado con la complejidad de la inmunidad antígeno específica, ha sido mantenido en vertebrados superiores. Desde los trabajos iniciales sobre la fagocitina como compuesto microbicida en neutrófilo, posteriormente definida como α -defensinas (Ganz *et al.*, 1985) y de tionina (García-Olmedo *et al.*, 1998), primer PAE caracterizado químicamente, hasta la actualidad, más de 2000 secuencias han sido descritas. Existen diversas bases de datos dedicadas exclusivamente a recoger descripciones de PAEs, que evidencian la complejidad de dicho sistema (<http://pepbank.mgh.harvard.edu>, <http://www.bbcm.units.it/~tossi/amsdb.html>, <http://aps.unmc.edu/AP/main>).

En vertebrados superiores su función principal es la de servir de primera barrera de defensa frente a la infección por un patógeno, abortándola o retrasando su diseminación hasta que se desarrolla la respuesta inmune adaptativa, con cuyos componentes colaboran (Hancock y Sahl, 2006). Como tal se localizan anatómicamente en los sitios iniciales de contacto con el patógeno: piel, mucosas o secreciones, fluidos biológicos o células fagocíticas (Muller *et al.*, 2008). Adicionalmente potencian la fagocitosis, promueven el reclutamiento y la acumulación de células del sistema inmune en el foco de infección y neutralizan los efectos citotóxicos del LPS (Easton *et al.*, 2009; Jenssen *et al.*, 2006), así como favorecen la cicatrización y angiogénesis de la herida (Steinstraesser *et al.*, 2006). Al contrario de lo que sucede con los péptidos de origen procariota, los PAEs apenas sufren modificaciones postraduccionales, con la excepción de formación de puentes disulfuro y la amidación del extremo carboxilo terminal. Su expresión puede ser constitutiva o inducida en respuesta a citoquinas o endotoxinas bacterianas.

1.1.2.1. Clasificación de los PAEs

La primera clasificación de los PAE estaba basada su origen zoológico, pero debido a la gran diversidad estructural y a la coexistencia dentro de un mismo organismo de PAEs homólogos a grupos taxonómicos muy diferentes se ha adoptado una clasificación estructural, iniciada por Boman y ampliada por adición de nuevos grupos estructurales (Brogden, 2005; Oyston *et al.*, 2009) en cinco grupos principales:

- a) Péptidos lineales α -helicoidales; Cecropinas, dermaseptinas, melitina, magainina, LL-37, etc...
- b) Péptidos cíclicos con uno o más puentes disulfuro; Protegrinas, α y β -defensinas de mamíferos, tioninas, etc...
- c) Péptidos ricos en un aminoácido de baja frecuencia en proteínas; Indolicidina (W), histatinas (H), PR39 (P), etc...
- d) Péptidos derivados de la proteólisis de otras proteínas o de otros PAEs; Lactoferricina, casocinina I, hemocidinas, etc...
- e) Péptidos ciclados por enlace peptídico; θ -defensinas y ciclótidos.

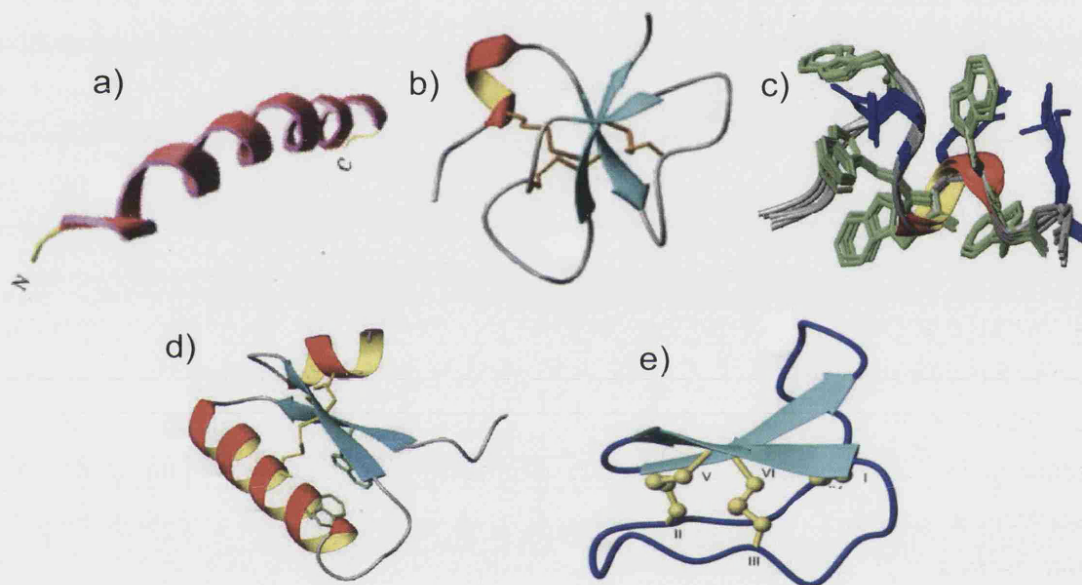


Figura 1.4. Estructura tridimensional de diferentes PAEs; a) Magainina, péptido α -helicoidal, b) β -defensina-2 humana, péptido ciclado mediante puentes disulfuro, c) Indolicidina, péptido rico en W, d) Lactoferricina humana, péptido derivado de la proteólisis de la lactoferrina humana, e) Ciclótido, péptido ciclado por enlace peptídico. Tomado de (Bulet *et al.*, 2004; Craik *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2006).

1.1.2.2. Mecanismo de acción de PAEs.

El principal mecanismo de acción de los PAEs se basa en su interacción con la membrana citoplasmática del patógeno, con daño de su estructura y permeabilización, que puede ocasionar *per se* la muerte del patógeno, o ser temporal y reversible, terminando por la translocación del PAE para acceder a sus dianas intracelulares. Conforme a dicha diferenciación en sus dianas finales los PAEs se clasifican en dos grandes grupos:

Introducción

i) Péptidos cuya acción letal se basa exclusivamente en la **permeabilización de la membrana plasmática**. Se basa en una acción puramente física, por la unión estequiométrica del péptido a los fosfolípidos aniónicos de la membrana del patógeno. No intervienen sistemas de transporte o bombas iónicas, por lo que los enantiómeros sintéticos todo-D son igual de eficaces que el péptido natural. El efecto letal es muy rápido, cursando con despolarización de la membrana plasmática y liberación de metabolitos intracelulares.

Dentro de la diversidad de secuencias en los PAEs, dos características son esenciales para su actividad microbicida: i) su carácter catiónico, necesario para una interacción específica con los fosfolípidos aniónicos del patógeno, y ii) poseer una estructura anfipática que facilite su inserción a la membrana. Dicha anfipaticidad puede ser intrínseca al péptido, como ocurre en PAEs con alta restricción conformacional, o ser inducida tras su contacto con la membrana plasmática del patógeno, para aquellos con estructuras flexibles y de conformación no definida en medio acuoso. Se han propuesto 5 modelos principales que explican dicho proceso (Fig. 1.5) (Chan *et al.*, 2006):

A) Modelo de *duelas de barril*. Los monómeros de péptido se disponen perpendicularmente al plano de la bicapa lipídica, formando por agregación un poro con luz hidrofílica a través de la cual existe flujo de iones y otras moléculas hidrosolubles. En este caso la afinidad péptido-péptido es mayor que la afinidad péptido-fosfolípido, por ello presenta baja especificidad de reconocimiento de membrana.

B) Modelo de *alfombra*. Las moléculas de péptido se disponen de forma paralela a la bicapa, actuando como un detergente, por perturbación del empaquetamiento de los fosfolípidos, con discontinuidades transitorias implicadas en la salida del contenido intracelular. A alta densidad, el péptido unido origina la micelización de la membrana.

C) Modelo de *agujero de gusano, poro toroidal o modelo de dos estados*. A baja concentración de péptido, éste se acumula en la membrana, expandiendo la cara externa de la misma y creando una tensión mecánica. Una vez que ésta ha alcanzando un valor crítico, dicha tensión se relaja mediante disposición de parte de los monómeros perpendicularmente respecto al plano de la membrana, con mantenimiento de la interacción con las cabezas de los fosfolípidos y formación de un poro transitorio mixto péptido-fosfolípido de estequiometría variable que facilita el tránsito de solutos y flip-flop de lípidos. Cuando el poro se desintegra, los monómeros del péptido se reparten a ambos lados de la membrana, posibilitando su interacción con otras dianas intracelulares. Este modelo, que participa de los dos anteriores, es quizá el más general y real al proceso de permeabilización.

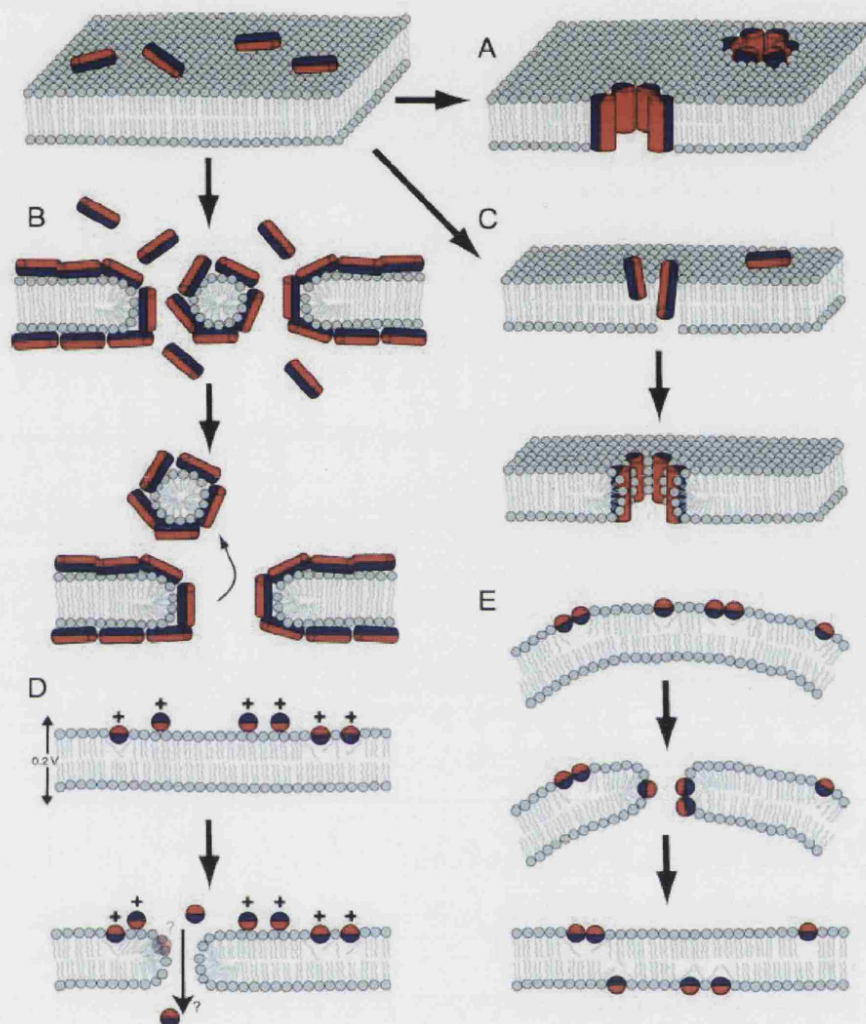


Figura I.5. Modelos propuestos de permeabilización de membrana plasmática de PAEs. A) Modelo de duelas de barril. B) Modelo de tapizado, C) Modelo de agujero de gusano, poro toroidal o modelo de dos estados, D) Modelo de electroporación molecular, y E) Modelo de colapso de balsa. Tomado de Chan et al., 2006.(Chan et al., 2006).

D) Modelo de *electroporación molecular*. Los péptidos catiónicos unidos a la cara externa de la membrana generan una diferencia de potencial eléctrico a través de la misma, que a un valor de 0.2V causa la inserción profunda del péptido en la estructura de membrana.

E) Modelo de *colapso de balsa*. Este modelo propone que la unión de péptidos anfipáticos causa un desequilibrio de masa, y como consecuencia un incremento en la curvatura de la membrana. Los péptidos van a atravesar la membrana, creando poros transitorios, tras la desintegración del poro el péptido se distribuye a ambos lados de la

Introducción

membrana.

ii) Péptidos que poseen **dianas intracelulares**. Un número creciente de péptidos antimicrobianos basan su mecanismo letal en la interacción con dianas intracelulares. El acceso del péptido al interior celular sucede de forma similar a la descrita para el modelo de agujero de gusano, a diferencia de que la estabilidad del poro es muy inferior, lo que determina que los daños en la membrana sean en general más leves, transitorios y reversibles. Una vez en el interior de la célula se unen a sus dianas e interfieren con sus correspondientes funciones. En general requieren una interacción quiral entre el péptido y su diana, por ello los enantiómeros D suelen ser inactivos. La definición de sus dianas no siempre es evidente y es particular para cada péptido; alteración de la formación del septo de la membrana celular con filamentación en bacterias (PR-39 e indolicidina), inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (buforina II, dermaseptina, pleurocidina, indolicidina, PR39...), o inhibición de la actividad enzimática de DnaK (pirrocoricina) o F_0F_1 -ATPasa (histatinas), (Brogden, 2005; Giuliani *et al.*, 2008).

Determinados PAEs poseen otras funciones no asociadas a su actividad microbici da directa; aquellos activos sobre Gram-negativas son antiendotóxicos al precisar la destrucción de la ME por su interacción con el LPS, y juegan un importante papel como inhibidores del shock séptico provocado por la liberación de endotoxinas, común en otros antibióticos; otros actúan como quimocinas (LL-37 y las α y β -defensinas humanas), promueven la maduración y activación de células dendríticas, regulan la expresión de TNF- α e IL-1, controlan los niveles de degranulación de mastocitos y promueven la fagocitosis (Steinstraesser *et al.*, 2009). También pueden estimular la producción de NO (Berkestedt *et al.*, 2008) y potenciar la angiogénesis (PR-39) (Steinstraesser *et al.*, 2006). Por otro lado, PR-39 favorece la cicatrización y la restenosis coronaria evitando isquemia (Ikeda *et al.*, 2001). Además de su actividad sobre patógenos, PAEs tales como cecropina, magainina 2 y buforina 2 entre otros poseen actividad tumoricida (Schweizer, 2009).

1.1.2.3. Síntesis química de PAEs y modificaciones de péptidos naturales .

Dentro de los PAEs, los péptidos lineales han sido los más estudiados para su posible utilización clínica. Su tamaño y la escasez de modificaciones postraduccionales, generalmente circunscritas a la amidación de su extremo C-terminal, hacen que su síntesis química y modificación de secuencias sea sencilla y asequible. Por ello se han obtenido numerosos análogos artificiales para la obtención de relaciones estructura-actividad y de optimización de secuencias. Los objetivos

Introducción

finales perseguidos son: i) obtención de estructuras mínimas activas, que permitan el abaratamiento de síntesis y disminuyan el riesgo de inmunogenicidad; ii) Optimización de su actividad microbica; iii) Estabilidad frente a la degradación proteolítica en fluidos biológicos o por proteinasas del parásitos. Un esbozo de las estrategias utilizadas se resume en la tabla I.4 con ejemplos prototípicos.

Tabla I.4. Ejemplos de estrategias de modificación de PAEs.

Modificación	Ejemplo	Resultado de la modificación	Referencia
Acortamiento de secuencia	Cecropina A	Determinación de secuencia mínima activa	(Andreu <i>et al.</i> , 1985)
Fluoración de aminoácidos	Magainina 2 y buforina	Aumento de hidrofobicidad y estabilidad a proteasas	(Meng y Kumar, 2007)
Intercambio de dominios	Magainina 2	Modificación de actividad antimicrobiana y hemolítica	(Guerrero <i>et al.</i> , 2004; Tachi <i>et al.</i> , 2002)
Ciclación por puentes disulfuro	Histatina 1	Mejora de la actividad de reepitelización	(Oudhoff <i>et al.</i> , 2009)
Ciclación por puentes disulfuro intracatenarios	β -defensina Defr1	Incremento de actividad antimicrobiana	(Taylor <i>et al.</i> , 2007)
Heterodimerización	Disclintina	Mejora de la interacción con membranas y estabilidad a proteasas	(Resende <i>et al.</i> , 2009)
Dimerización por puentes disulfuro intercatenarios	Bactenecina 5	Incremento de actividad antimicrobiana y menor inactivación por fuerza iónica	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
Retro-, enantio-péptidos	Cecropina A-Melitina	Incremento de actividad antimicrobiana	(Merrifield <i>et al.</i> , 1995)
Formación de unión Trp-Trp intercatenarios	Indolicidina	Estabilidad a proteasas	(Osapay <i>et al.</i> , 2000)
Combinación lineal de péptidos con diferente actividad antimicrobiana	Dermaseptina-péptido inhibidor ARNasa III	Actividades sinérgicas en una misma molécula.	(Balaban <i>et al.</i> , 2004)
Acilación de grupos NH ₂	Cecropina A-Melitina	Incremento de actividad antimicrobiana	(Chicharro <i>et al.</i> , 2001)
Trimetilación de grupos NH ₂	Melitina	Disminución de la citotoxicidad	(Ramalingam y Bello, 1992)
Peptoides (Incorporación de derivados de aminoácidos no naturales)	Ampeptoides	Cambios conformacionales y estabilidad a proteasas	(Chongsiriwatana <i>et al.</i> , 2008)

Introducción

Modificación	Ejemplo	Resultado de la modificación	Referencia
Formación de diastereómeros	Péptidos lineales en α -hélice	Disminución de citotoxicidad y estabilidad a proteasas	(Shai y Oren, 2001)
Bromación de Trp	Estielina D	Incremento de actividad antimicrobiana frente a Gram-positivos	(Taylor <i>et al.</i> , 2000)
Remplazo de residuos	Bactenecina 2	Incremento de actividad antimicrobiana	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
Incremento de cargas positivas	LL-37	Incremento de actividad antimicrobiana	(Burton y Steel, 2009)

1.1.2.4. Ventajas del uso de PAEs frente a antibióticos convencionales.

El desarrollo de antibióticos convencionales suele basarse en el concepto de interacción del antibiótico con una diana principal y actuación a través de un único modo de acción. Sin embargo, la actividad de los PAEs es muy amplia, lo que les confiere un gran potencial terapéutico. Pueden ser utilizados como antimicrobianos por sí mismos, o en combinación sinérgica con otros antibióticos, para neutralizar un efecto endotóxico, o como inmunomoduladores (Marr *et al.*, 2006). Otra de las grandes ventajas de los PAEs frente a los antibióticos convencionales es la exigencia que supone al patógeno la inducción de resistencias frente a PAEs, de difícil consecución, puesto que los componentes aniónicos de las membranas celulares (glicolípidos, ácidos teicoicos y fosfolípidos) que contribuyen a la interacción con los péptidos, son constituyentes esenciales de la arquitectura de membrana y la sustitución de las mismas implicaría la alteración simultánea de numerosos sistemas enzimáticos y de transporte, y por tanto poco probables (Nizet, 2006). Sin embargo existen mecanismos de resistencia a PAEs, como la neutralización de la carga negativa de los ácidos lipoteicoicos por adición de D-alanina, o del LPS por adición de Ara4N o EtN (Peschel y Sahl, 2006). La producción de peptidasas y proteasas es otra de las estrategias de resistencia desarrollada por los patógenos, especialmente frente a péptidos lineales como LL-37, y cuyas secuencias de corte son, en principio, más accesibles (Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004). Otro mecanismo es la actividad de bombas de expulsión (Tzeng *et al.*, 2005) que eliminan el péptido insertado en la membrana.

Existen 4 péptidos que han alcanzado la fase III en ensayos clínicos: la magainina MSI-78 o Pexigano, indicada en el tratamiento del impétigo y las úlceras derivadas de la diabetes (Nelson *et al.*, 2006); la protegrina de cerdo IB-367 o Isegranano, ensayada en el tratamiento de la mucositis oral (Trotti *et al.*, 2004); la proteína humana rBPI₂₃ o

Introducción

Neuprex, para endotoxemia (Jellema *et al.*, 2002); y la indolicidina CP-226 u Omiganano, utilizada para prevenir infecciones asociadas a cateterismo (Hancock y Sahl, 2006). Finalmente, como prevención de infecciones asociado a trasplantes de médula ósea se alcanzó fase II con lactoferricina (Hancock y Sahl, 2006).

1.1.2.5. Péptidos híbridos cecropina A-melitina.

En 1981 Bomann y colaboradores aislaron las cecropinas A, B y D, péptidos presentes en la larva de *Hyalophora cecropia* y caracterizaron su acción microbicida (Steiner *et al.*, 1981). Las cecropinas son péptidos catiónicos lineales de 35 a 39 aminoácidos, ricos en Lys y con el extremo C-terminal amidado, muy activos frente a Gram-negativos, pero de baja actividad frente a Gram-positivas y prácticamente carecen de toxicidad sobre células eucariotas superiores. La cecropina A (KWKL⁵KKIEK¹⁰VGQNI¹⁵RDGII²⁰KAGPA²⁵VAVVG³⁰QATQI³⁵AK-NH₂), sin estructura en medio acuoso, la adquiere como 2 fragmentos helicoidales unidos por una secuencia bisagra Ala-Gly-Pro en presencia de solventes que mimetizan la membrana tras unión a la misma. La hélice N-terminal (residuos 1-21) es muy catiónica, mientras que la C-terminal (residuos 25-37) es muy hidrofóbica (Durell *et al.*, 1992; Holak *et al.*, 1988).

La melitina (GIGAV⁵LKVLT¹⁰TGLPA¹⁵LISWI²⁰KRKRQ²⁵Q-NH₂) es el principal componente del veneno de la abeja melífera europea (*Apis mellifera*) (Habermann, 1972). Es un péptido de 26 aminoácidos, que a semejanza de la cecropina A se estructura en dos dominios α -helicoidales unidos por una bisagra, cuya característica es inversa: un extremo N-terminal hidrofóbico (residuos 1-20) y el C-terminal básico (residuos 21-26). La melitina es activa frente a una amplia variedad de microorganismos, pero es muy hemolítica, esencialmente debido a su extremo C-terminal (DeGrado *et al.*, 1982).

Los péptidos híbridos cecropina A-melitina, combinan el extremo N-terminal hidrofílico de la cecropina A, seguido del extremo N-terminal, hidrofóbico, de la melitina, excluyendo la región hemolítica de esta última, mejoraron las prestaciones microbiológicas de los péptidos parentales con actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, a protozoos y con una toxicidad muy disminuida (Andreu *et al.*, 1992; Boman *et al.*, 1989; Merrifield *et al.*, 1995). Los péptidos híbridos cecropina A-melitina son activos frente a una amplia variedad de patógenos: *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) (Giacometti *et al.*, 2004), cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* (Alarcon *et al.*, 2001; Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2006; Saugar *et al.*, 2006), bacterias y hongos patógenos de plantas (Cavallarin *et al.*, 1998;

Introducción

Ferre *et al.*, 2006; Yevtushenko *et al.*, 2005), protozoos parásitos como *Plasmodium* (Merrifield *et al.*, 1994), *Leishmania* (Díaz-Achirica *et al.*, 1998; Luque-Ortega *et al.*, 2003) y *Toxoplasma* (Seeber, 2000). Adicionalmente se ha descrito su actividad frente a células tumorales (Shin *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1997). También han sido ensayados sobre bacterias en combinación sinérgica con otros fármacos (Giacometti *et al.*, 2003; Giacometti *et al.*, 2004). El potencial terapéutico de los mismos se ha demostrado en modelos animales de queratitis ocular por *Pseudomonas* (Nos-Barbera *et al.*, 1997) y leishmaniasis canina (Alberola *et al.*, 2004). Estos péptidos han sido objeto de numerosas modificaciones destinadas a mejorar su índice terapéutico, además del mencionado acortamiento de secuencias, se han explorado sus isómeros ópticos (enantio-, retro- y retroenantiómeros) (Vunnam *et al.*, 1998), modificaciones por succinilación (Fernandez *et al.*, 1994) y acilación de los grupos amino (Chicharro *et al.*, 2001), así como inserción de análogos de Phe (Mathur *et al.*, 2007b).

En el presente trabajo se han empleado una serie de péptidos híbridos cecropina A-melitina proporcionados por el Prof. Andreu del *Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, de la Universitat Pompeu Fabra*, cuyas secuencias se detallan en los apartados 4.1.2.1 y 4.3.2.1.

1.1.2.6. LL-37, PAE derivado de la catelicidina humana hCAP18.

Las catelicidinas son una familia de péptidos antimicrobianos presentes en mamíferos, y extendidas recientemente a aves (Xiao *et al.*, 2006), reptiles (Zhao *et al.*, 2008) y peces (Chang *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2008; Uzzell *et al.*, 2003), incluyendo las mixinas, agnatos, que evidencian su aparición temprana en la filogénesis de los organismos superiores. El número de genes varía desde siete en caballo, cerdo y oveja, hasta un único gen en roedores y primates, incluido el hombre (Burton y Steel, 2009).

Las catelicidinas son sintetizadas por leucocitos y células epiteliales, y almacenadas intracelularmente en gránulos. Todos los miembros de la familia son sintetizados como preproteínas, con péptido señal (aproximadamente de 30 aminoácidos), un dominio N-terminal altamente conservado (de aproximadamente 100 aminoácidos) de cuya semejanza al inhibidor de cisteína proteinasa catelina toma el nombre, y un dominio C-terminal variable, responsable de la actividad antimicrobiana. El procesamiento supone la escisión temprana del péptido señal y almacenamiento como propéptido, hasta la liberación del péptido maduro tras procesamiento proteolítico (Durr *et al.*, 2006). Las catelicidinas, al compartir únicamente el dominio catelina, muestran una amplia variedad de secuencias y estructuras secundarias

Introducción

desde péptidos α -helicodales (LL-37), ricos en un aminoácido (indolicidina) o con enlaces disulfuro (protegrinas) (Ramanathan *et al.*, 2002).

La catelicidina humana hCAP18 es la única proteína de esta familia presente en el hombre, su dominio C-terminal es un péptido denominado LL-37 de 37 residuos (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES) con una carga neta de +6 a pH fisiológico. LL-37 fue descrito por primera vez en leucocitos y testículos, y posteriormente en otras células (mielocitos, metamielocitos, queratinocitos...), tejidos (piel, uñas, pulmón...) y fluidos (saliva, líquido amniótico, mucosas...) (Durr *et al.*, 2006). Estímulos externos como butirato, ácido lipoteicoico y LPS incrementan su expresión (Stie *et al.*, 2007). Su activación, por proteólisis de su dominio catalina, tiene lugar en la superficie celular por la serina proteinasa 3 (Sorensen *et al.*, 2001). Aparte de su acumulación intracelular, en el plasma humano existe un depósito importante de hCAP18 acompañado con lipoproteínas del plasma (Sorensen y Borregaard, 2005).

A) Funciones de LL-37.

LL-37 posee actividades bactericida, antifúngica, antiviral (den Hertog *et al.*, 2005), y es inhibidor de la formación de *biofilm* bacteriano (Overhage *et al.*, 2008) (Bergman *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008a). Las deficiencias de expresión de LL-37 se asocian a una mayor susceptibilidad a patógenos (Burton y Steel, 2009). LL-37 también ejerce una función antiendotóxica (Nijnik y Hancock, 2009), tanto por interacción con LPS y ácido lipoteicoico (ALT), como por modulación de la respuesta mediada por TLRs (Receptores Tipo Toll); por ejemplo, suprime la expresión de las moléculas proinflamatorias IL-6 y TNF- α , e inhibe la apoptosis de neutrófilos. Promueve la diferenciación de células dendríticas, la maduración y diferenciación de monocitos a macrófagos, a los que puede también activarlos directamente, con liberación de quimocinas que promueven la migración de leucocitos a la zona de infección. También induce la expresión de IL-12 (Hamill *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007), y potencia la angiogénesis (Steinstraesser *et al.*, 2009). La importancia de dichas actividades extramicrobidas fueron demostradas en un modelo animal de infección por *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica*, análogos cortos de LL-37 (12 - 13 residuos), carentes de actividad microbida *in vitro*, protegieron *in vivo* de la infección; asimismo LL-37, protegió a concentraciones submicrobidas *in vitro* (Bowdish *et al.*, 2005).

Introducción

B) Estructura y modificaciones.

LL-37 presenta una estructura desordenada en solución acuosa y de α -hélice en presencia de solventes que mimetizan membranas o unido a ellas (Henzler-Wildman *et al.*, 2004). Por RMN, LL-37 unido a micelas de dodecilmfosfatidilcolina se estructura en tres regiones; la N-terminal, la más hidrofóbica y estructura helicoidal inestable, que se interrumpe en K-12, seguida de la región central, la más estructurada, y finalmente la región C-terminal con una pequeña cola hidrofílica (Porcelli *et al.*, 2008) (Fig. I.6.)

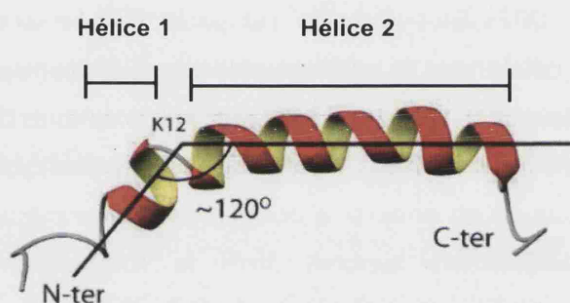


Figura I.6. Estructura representativa de LL-37. Modificado de Porcelli y cols, 2008.

Las relaciones estructura-actividad demuestran que LL-12 carece de actividad antimicrobiana y antiendotóxica, pero el fragmento 30-37 sí la mantiene (Nell *et al.*, 2006; Sorensen y Borregaard, 2005). Diversos diastereómeros reducen la toxicidad del péptido parental, pero mantienen su efecto microbicida (Li *et al.*, 2006). El incremento de carga positiva por sustitución de D-26, Q-22 y N-30 por K, aumentó significativamente la actividad frente a SARM. En la piel humana se han identificado péptidos truncados originados por proteólisis de LL-37 (KS-30, FK22, LL-31, KR-20 y EK-20) superiores al parental en actividad microbicida pero con inferior capacidad inmunomoduladora, que sugiere que la proteólisis específica y limitada es un mecanismo modulador *in vivo* de LL-37 (Burton y Steel, 2009).

1.2. PATÓGENOS DIANA DE LOS PÉPTIDOS OBJETO DEL PRESENTE ESTUDIO.

En la presente tesis se han seleccionado tres microorganismos patógenos para establecer las bases moleculares de actividad y resistencia de un grupo de péptidos activos en membrana. Como modelo de eucariota inferior se ha seleccionado el protozoo parásito *Leishmania* y como modelos procariotas se han seleccionado *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus* representativos de Gram-negativos y Gram-positivos respectivamente. Sus características morfológicas y moleculares, las manifestaciones clínicas derivadas de la infección, así como las distintas alternativas terapéuticas de las infecciones que causan son descritas a continuación en mayor detalle.

1.2.1. LEISHMANIA Y LEISHMANIASIS

El término leishmaniasis comprende un conjunto de patologías muy diferentes entre sí, causadas por la infección de las distintas especies del protozoo parásito *Leishmania*. El parásito es transmitido por la picadura de las hembras de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* en el Viejo y en el Nuevo Mundo, respectivamente. La leishmaniasis, excepto en zonas urbanas densamente pobladas, es una zoonosis, donde determinados mamíferos, tanto domésticos como silvestres, actúan como reservorio. La enfermedad es endémica en 88 países (Fig. 1.7), ubicados principalmente en áreas tropicales, subtropicales y templadas de América Central y del Sur, Próximo y Medio Oriente, India, Kenia, Sudán, Bangladesh, China y países de la cuenca mediterránea. La O.M.S. estima una prevalencia global de la enfermedad que oscila entre 12 y 14 millones de personas, con una incidencia anual cercana a los 2 millones y una población en riesgo de 350 millones aproximadamente (<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>). El incremento global de casos se asocia a la situación de subdesarrollo de las principales zonas endémicas, con problemas de desnutrición y escasa o nula cobertura sanitaria (Alvar *et al.*, 2006b), así como a la invasión de dichas zonas por individuos no inmunes para la explotación económica de las mismas, mejor diagnóstico de la enfermedad, y a la aparición de resistencias frente a los fármacos habituales. El aumento de la incidencia de la enfermedad en el mundo desarrollado se debe al carácter de *Leishmania* como patógeno oportunista, asociado a casos de inmunodepresión tanto por quimioterapia (leucemia, trasplantes), como por infección por VIH, descrita en 33 países y con mayor relevancia en el sureste de Europa (Alvar *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2006).

Introducción

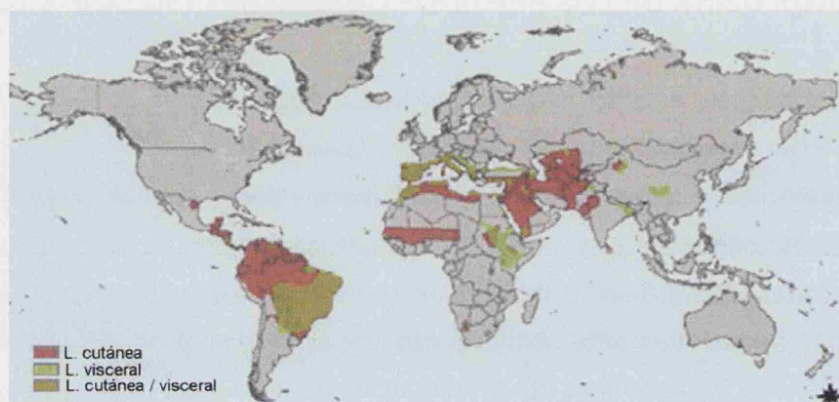


Figura I.7. Distribución mundial de la leishmaniasis según sus diferentes manifestaciones clínicas (véase apartado 1.2.2.). Datos de la O.M.S.

1.2.1.1. Taxonomía del género.

El género *Leishmania* fue citado por primera vez por Cunningham en 1895, descrito posteriormente por Leishman, Donovan y Wright y, finalmente establecido por Ross en 1903 (Peters, 1988). Taxonómicamente pertenece al Reino Protozoa, Filo Euglenozoa, constituido por protozoos unicelulares, flagelados, con crestas mitocondriales discoidales y mitosis cerrada. Se incluye en la clase Kinetoplasta por poseer una única mitocondria con una especialización estructural denominada kinetoplasto, formada por círculos concatenados de ADN y cercano a la base del flagelo. Pertenecen al Orden Trypanosomida, Familia Trypanosomatidae, que también engloba el género *Trypanosoma* y otros siete géneros más (Banuls *et al.*, 2007; Cavalier-Smith, 1998). Atendiendo a su homología filogenética, las especies del género *Leishmania* se agrupan en diferentes complejos. En España, la especie responsable de la infección es *Leishmania infantum*, perteneciente al complejo *donovani*.

1.2.1.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La forma y gravedad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen tanto de la especie infectante como del estado inmunológico del hospedador (Handman, 1999). A pesar de la heterogeneidad en la sintomatología y patología de las leishmaniasis, todas sus manifestaciones clínicas comparten como rasgo común la parasitación de células del sistema mononuclear-fagocítico. Tradicionalmente se distinguen tres tipos básicos de leishmaniasis: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral (Fig. I.8) (Alvar *et al.*, 2006a).

Introducción

Leishmaniasis cutánea: Todas presentan como característica común la aparición de úlceras cutáneas en el lugar de la picadura del vector, generalmente en zonas expuestas del cuerpo (cara, brazos o piernas). Existe diversidad patológica dependiendo de la especie causante de la enfermedad. Atendiendo a su distribución geográfica se distinguen las leishmaniasis cutáneas del Viejo y del Nuevo Mundo; Las especies responsables de las **leishmaniasis cutáneas del Viejo Mundo** son:

- *L. major*. Se caracteriza por la aparición de una pápula eritematosa a las 4-6 semanas de la picadura, sobre la que se forma una costra, que al desprenderse origina una úlcera húmeda. Generalmente es de evolución benigna y cura espontáneamente. Recibe el nombre de leishmaniasis cutánea rural o zoonótica, al tratarse de una zoonosis propia de zonas rurales o periurbanas del norte y este de África, oeste de Asia y Asia Menor.
- *L. tropica*. Es responsable de la leishmaniasis cutánea urbana o antroponótica, se diferencia de la anterior por la ausencia de exudado de la úlcera. Generalmente cura espontáneamente, pero puede complicarse causando la leishmaniasis cutánea recidivante, de evolución lenta y escasa carga parasitaria que persiste de por vida. Aparece en el sureste de Europa, nor- y suroeste de África, península Arábiga, Afganistán, Oriente Medio e India.
- *L. aethiopica*. Produce una úlcera de curación espontánea. En un pequeño porcentaje puede complicarse y originar una forma mucocutánea, y más raramente una forma cutánea difusa. Aparece en el este de África.

La **leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo** recibe diversos nombres dependiendo de las manifestaciones y el país, se extiende desde el norte de Argentina hasta el sur de México. Las especies responsables de la infección son:

- *L. mexicana*. Provoca destrucción del cartílago del pabellón auditivo y recibe el nombre de úlcera de los chicleros.
- *L. amazonensis*. Se caracteriza por su evolución hacia una forma difusa y por su reticencia a la curación.

Leishmaniasis mucocutánea: La leishmaniasis mucocutánea es típica del continente americano, es producida por especies del complejo *braziliensis*, especialmente *L. braziliensis* y *L. panamensis*, cursa con úlceras cutáneas que curan inicialmente, pero tras la lesión primaria *Leishmania* migra por vía linfática hacia la orofaringe, provocando graves lesiones del cartílago de las cavidades orofaríngea y nasal (Alvar et al., 2006a).

Introducción

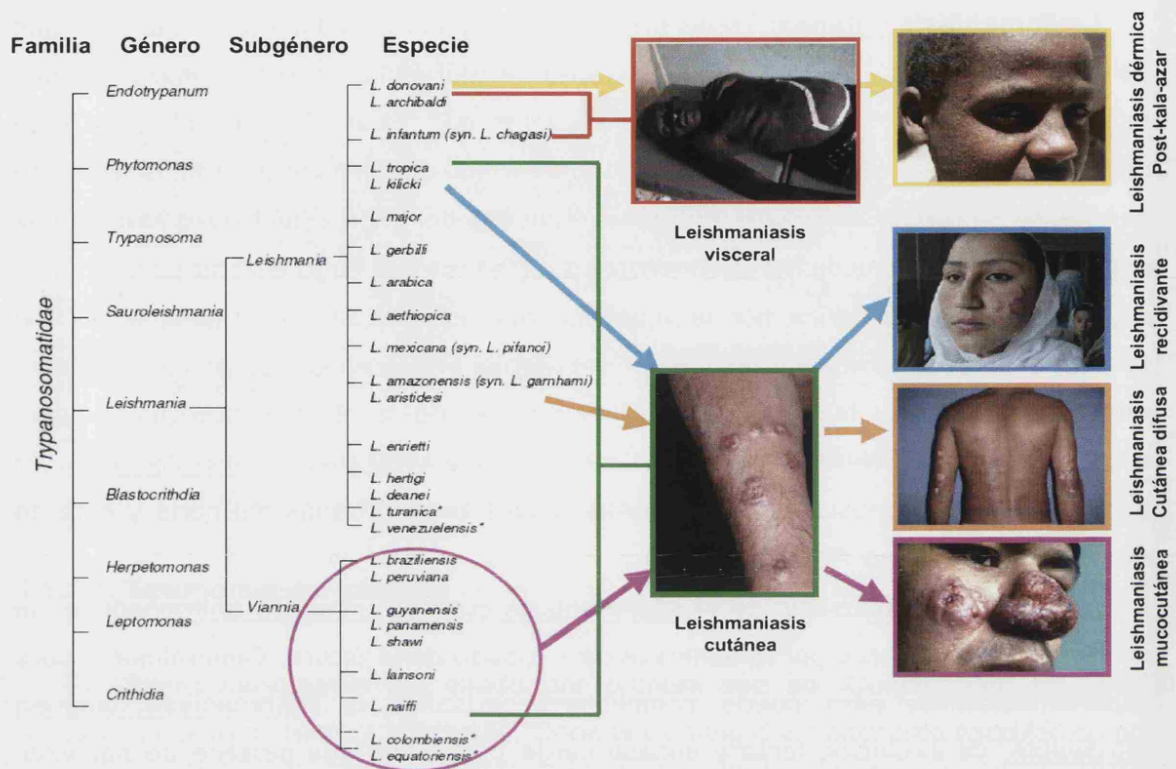


Figura 1.8. Clasificación taxonómica de *Leishmania* y manifestaciones clínicas en función de la especie infectante. Modificado de Alvar J. y cols., 2006.

Leishmaniasis visceral: Es la forma más grave de la enfermedad, con una mortalidad cercana al 100% si no es tratada. Es producida por *L. infantum* y *L. donovani* en el Viejo Mundo y por *L. chagasi* en América. La enfermedad cursa con la invasión de las células del sistema mononuclear fagocítico del hígado, bazo, médula ósea y mucosa intestinal, principalmente. El periodo de incubación es variable, pudiendo durar hasta un año, con aparición gradual de sus manifestaciones clínicas, los primeros signos son fiebre, anorexia y palidez, posteriormente aparece hepato-, esplenomegalia, y leucopenia que finaliza en pancitopenia. Existen dos formas de la enfermedad dependiendo de la especie causante; *L. chagasi* y *L. infantum* son causantes de la leishmaniasis visceral zoonótica, es una zoonosis presente en América Central y del Sur o la cuenca mediterránea, respectivamente. *L. donovani* causa leishmaniasis visceral antroponótica o kala-zar, presente en la India, Nepal, Sudán, Bagladesh y Etiopía. En ocasiones, años después de una curación aparente aparece una serie de nódulos indurados dispersos en la piel, originando la leishmaniasis dérmica post-kala-zar, de difícil tratamiento y asociada habitualmente a un terapia previa ineficaz (Zijlstra *et al.*, 2003).

1.2.1.3. Ciclo biológico del parásito.

Leishmania es un protozoo digénico con dos tipos morfológicos principales: el promastigote, la forma flagelada móvil presente en el tubo digestivo del insecto díptero vector (hembras de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo), y el amastigote, forma carente de flagelo y parásito intracelular obligado de las células del sistema mononuclear-fagocítico del hospedador vertebrado (Handman, 2001).

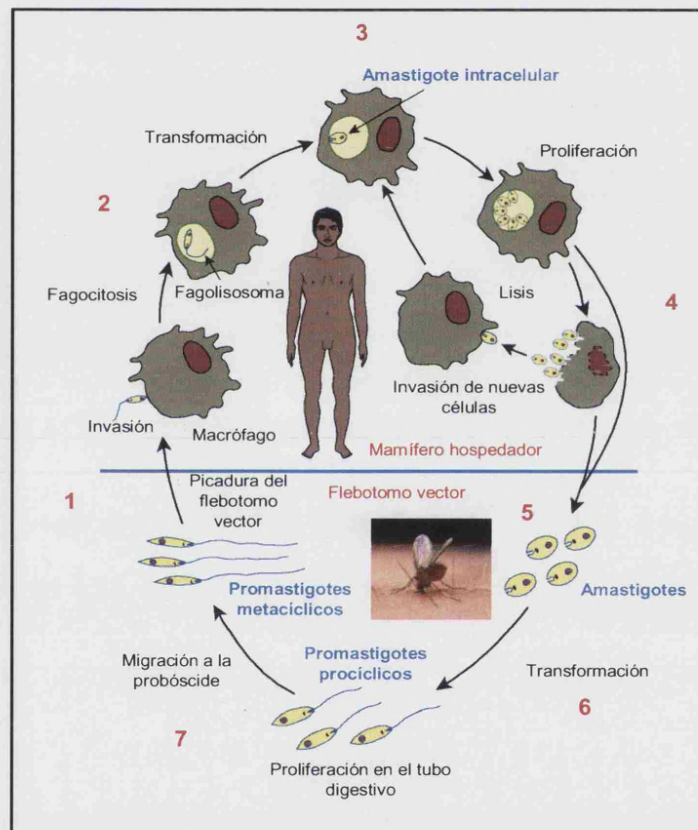


Figura I.9. Ciclo biológico de leishmania. 1. Inoculación de promastigotes metacíclicos por la picadura del flebotomo hembra. 2. Fagocitosis de los promastigotes por los macrófagos. 3. Diferenciación del promastigote a amastigote en el fagolisosoma y multiplicación de los amastigotes. 4. Lisis del macrófago parasitado, liberación de los amastigotes y diseminación de la infección por fagocitosis de los mismos por nuevos macrófagos. 5. Ingestión de macrófagos parasitados con amastigotes durante la alimentación hematofaga del flebotomo y liberación de amastigotes en el tubo digestivo del vector. 6. Transformación de amastigotes en promastigotes procíclicos. 7. División de los promastigotes, unión a las células del epitelio digestivo. Metaciclogénesis y migración a la probóscide. (Modificado de Handman E., 2001).

El ciclo biológico de *Leishmania* (Fig. I. 9) implica la transmisión de los amastigotes que residen en el hospedador mamífero infectado a un flebotomo hembra cuando éste

Introducción

pica al mamífero para alimentarse de su sangre. Los amastigotes ingeridos se diferencian a promastigotes dentro del tubo digestivo del díptero. La sangre ingerida con los parásitos es rápidamente rodeada por una membrana peritrófica, una matriz compuesta por quitina segregada por las células epiteliales del tubo digestivo (Secundino *et al.*, 2005). Los macrófagos son lisados quedando libres los amastigotes que se transforman en promastigotes, que secretan quitinasas permitiendo su liberación de la membrana peritrófica (Kamhawi, 2006). El periodo del parásito dentro del vector es aproximadamente de una semana a diez días, con diferentes fases y morfología del parásito. Cronológicamente, el primer estado es el de forma procíclica, ligeramente móvil y con morfología corta y ovoide. Posteriormente los promastigotes migran hacia la parte anterior del tubo digestivo del díptero, donde experimentan la metacicloogénesis con incremento de la longitud del flagelo, alargamiento de la forma, reducción de la capacidad de división y un aumento de la infectividad (Sacks y Perkins, 1984). Los promastigotes metacíclicos son transmitidos en la ingestión de la sangre de un nuevo hospedador, favorecido por la destrucción y obstrucción de la válvula estomodeal del insecto por enzimas quitinolíticos, y formación de agregados de parásitos por aglutinación con proteoglicanos secretados por los promastigotes, respectivamente, causando un reflujo de la sangre ingestada, y consecuentemente una mejor inoculación de los parásitos en el vertebrado (Kamhawi, 2006). Dichos promastigotes son rápidamente fagocitados por macrófagos y neutrófilos, e internalizados en el fagosoma, donde los promastigotes se transforman en amastigotes que implican cambios en la composición de membrana, de morfología, metabolismo y patrón antigénico causados por la mayor temperatura y pH ácido. Simultáneamente existe una maduración del fagosoma hacia su estadio final, la vacuola parasitófora (Courret *et al.*, 2001). El parásito interviene en dicho proceso de maduración; el lipofosfoglicano (LPG) obstaculiza el reclutamiento de Rab7p, implicada en la interacción del fagosoma con los endosomas tardíos (Antoine *et al.*, 2004), y su fusión con los endolisosomas, al favorecer la permanencia de la actina F alrededor del fagosoma (Lodge y Descoteaux, 2005). Este retardo en la maduración del fagosoma permite la diferenciación de promastigote a amastigote bajo condiciones permisivas, por su mayor susceptibilidad a las hidrolasas y al pH ácido del fagolisosoma que el amastigote (Antoine *et al.*, 2004). Finalizada la transformación, los amastigotes comienzan a dividirse en el interior de la vacuola parasitófora, hasta lisis del macrófago, con liberación de los parásitos al medio, e infección de nuevos macrófagos, donde la cinética de maduración del fagosoma es normal, lo que evidencia la adaptación del amastigote a las condiciones del fagolisosoma (Lodge y Descoteaux, 2005)

Introducción

La unión y fagocitosis de *Leishmania* a las células huésped implica diversos receptores; en células dendríticas la unión a ambas formas del parásito está mediada por el receptor DC-SIGN (Colmenares *et al.*, 2004; Colmenares *et al.*, 2002). En macrófagos, se ha descrito un amplio número de receptores involucrados en la unión al promastigote: receptor de fibronectina, receptor de manosa/fucosa, CR1 (el receptor para C3b y C4b), CR3 (que une iC3b, ICAM-1 y proteínas de la matriz extracelular) y receptor para la proteína C reactiva, que se unen directamente a ligandos de la superficie del parásito, como LPG y Gp63 (proteína mayoritaria de la superficie del parásito), o indirectamente a través de la opsonización por componentes del complemento C3b, iC3b y la proteína C reactiva. Los amastigotes utilizan como ligando en macrófagos, CR3, receptor de fucosa/manosa y receptor de Fc de IgG. (Antoine *et al.*, 2004). Como consecuencia de la elección de dichos receptores, la entrada de *Leishmania* es silente para la respuesta proinflamatoria y oxidativa

Finalmente, el establecimiento o no de la enfermedad viene determinado por el balance entre los mecanismos defensivos del hospedador y los evasivos del parásito (apartado 1.2.1.5), desarrollados localmente en las cercanías de la lesión primaria, para las leishmaniasis cutáneas, o bien extendidos a órganos internos del hospedador (hígado, bazo y médula ósea) en las leishmaniasis viscerales.

El ciclo se completa cuando un flebotomo pica nuevamente a un hospedador parasitado e ingiere junto con la sangre los amastigotes circulantes o los macrófagos infectados.

1.2.1.4. Características morfológicas y moleculares de *Leishmania*.

El parásito presenta dos formas principales bien diferenciadas durante su ciclo biológico: el promastigote, de morfología fusiforme, con un tamaño de 15-24 μm x 2-4 μm y un único flagelo, y el amastigote, de morfología oval, carente de flagelo y con un tamaño de 2-3 μm .

Leishmania en su ciclo vital habita en dos ambientes muy diferentes: el tubo digestivo del insecto vector, y la vacuola parasitófora de los macrófagos del hospedador. La adaptación a medios tan dispares determina que la membrana plasmática del parásito, como interfase del mismo con el medio exterior, presente una serie de peculiaridades y sufra cambios drásticos en su composición durante los distintos estadios vitales del parásito. El componente principal de la membrana plasmática, especialmente del promastigote, es un denso glicocáliz formado por proteínas y oligosacáridos, anclados a la membrana por estructuras de tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Lodge y Descoteaux, 2005).

Introducción

Sus principales componentes son:

- Lipofosfoglicano (LPG). Es el componente principal del glicocálix del promastigote, con un número que puede alcanzar hasta 5×10^6 copias por célula. Está presente en toda la superficie celular, incluido el flagelo. En *L. donovani* estructuralmente está formado por cuatro dominios: i) anclaje a la membrana por estructura GPI (glicosilfosfatidilinositol), ii) núcleo oligosacárido, iii) cadena de disacáridos fosforilados de longitud variable, formada por repeticiones Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄, iv) estructuras terminales de galactosa y manosa (Descoteaux y Turco, 1999). Por el contrario, en el amastigote el número de copias de LPG por célula es muy inferior (10^2 - 10^3 copias por célula), comparte homología con el LPG del promastigote en el núcleo oligosacárido y en el anclaje tipo GPI (Guha-Niyogi *et al.*, 2001). Participa en la unión del promastigote a las células del epitelio digestivo del vector y proporciona resistencia a la lisis por las enzimas hidrolíticas del tubo digestivo y del lisosoma del macrófago. En *L. donovani* la longitud del LPG se duplica durante la metacicloogénesis, impidiendo la inserción del complejo de ataque del complemento a la membrana (Guha-Niyogi *et al.*, 2001). También actúa como ligando directo en la unión al macrófago mediante CR1 y tiene un papel fundamental en la evasión a la respuesta inmune innata y en procesos de transducción de señales del macrófago (apartado 1.2.1.5).
- Fosfolípidos de glicosilinositol (GIPs). Son los componentes más abundantes en la superficie celular de promastigotes y amastigotes (aproximadamente 10^7 copias por célula), son estructuras de tipo GPI, pero no actúan de anclaje de proteínas ni de polisacáridos de cadena larga (McConville *et al.*, 2002). Su importancia es mayor en amastigotes, debido a la práctica ausencia de LPG y de glicoproteínas de anclaje GPI. Según su composición de azúcares existen tres tipos principales; todos ellos presentan disacáridos de manosa, que actúan como ligandos de receptores de manosa en el macrófago. Inhiben la síntesis de NO del macrófago (Guha-Niyogi *et al.*, 2001).
- Glicoproteínas (Gp). La proteína mayoritaria de los promastigotes en *Leishmania* es la glicoproteína **Gp63** (aproximadamente 5×10^5 copias por célula), es una metaloproteínasa de 63 KDa con estructura GPI. La expresión en amastigotes es muy inferior y localizada en el bolsillo flagelar (Guha-Niyogi *et al.*, 2001), o en el interior de lisosomas (Ilg *et al.*, 1993). Actúa como factor de virulencia y protege al parásito frente a proteasas y péptidos antimicrobianos del hospedador, favorece la opsonización y fagocitosis, así como la migración del parásito en el hospedador al degradar componentes de la matriz extracelular (Yao, 2010). En amastigotes, a pesar de su baja expresión, incrementa la supervivencia del parásito en el macrófago (Chen

Introducción

et al., 2000).

Gp46 es una proteína de 46 KDa exclusiva de promastigotes (aproximadamente 4×10^5 copias por célula), anclada por GPI y ausente en las especies del complejo *braziliensis*. Su principal función es la de resistencia a la proteólisis (Lincoln *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 1991). Como tal, su expresión aumenta en promastigotes metacíclicos donde protege frente a la lisis por enzimas lisosomales (Beetham *et al.*, 1997).

- **Proteofosfoglicanos (PPGs)**. Son una familia de proteínas con abundante O-glicosilación, similares a las unidades repetitivas de disacárido fosforilado del LPG. Es el componente mayoritario de la matriz gelatinosa secretada por los promastigotes, y responsable de la regurgitación de sangre del flebotomo (ver apartado 1.2.1.3) (Rogers *et al.*, 2004). También protege al promastigote frente a la lisis por las enzimas digestivas del vector (Secundino *et al.*, 2010).
- **Composición lipídica**. La membrana plasmática del promastigote posee un 30% de esteroides, siendo el principal el ergosterol (tabla I.1). La proporción de fosfolípidos ácidos es mayor en *Leishmania* que en eucariotas superiores (Wassef *et al.*, 1985).

Aparte de los orgánulos comunes a otros eucariotas, *Leishmania* posee ciertas características, e incluso, orgánulos exclusivos:

- **Microtúbulos subpelliculares**: La membrana citoplasmática es recorrida por su cara interna, por una red de microtúbulos subpelliculares, que proporcionan a la célula la rigidez necesaria para mantener una morfología estable frente al estrés mecánico (Morgan *et al.*, 2002).
- **Kinetoplasto**: en el interior de la única mitocondria del parásito se encuentra una estructura típica de la clase Kinetoplasta (Clarek y Wallace, 1960), denominada kinetoplasto, se trata de un supracomplejo de moléculas circulares de ADN concatenadas, compuesta por maxi-y minicírculos. Mientras los maxicírculos codifican las proteínas hidrofóbicas mitocondriales, los minicírculos lo hacen para los ARN guías, implicados en la edición de RNA mitocondrial (Stuart y Panigrahi, 2002). Comprende todo el material genómico mitocondrial del parásito y representa hasta el 20% del total del ADN de la célula (Liu *et al.*, 2005).
- **Glicosoma**: Es un orgánulo único en los Kinetoplasta. En 1977 Opperdoes y Borst describieron por primera vez la asociación de nueve actividades enzimáticas en un orgánulo, dos de las cuales pertenecían al metabolismo del glicerol y las siete restantes a la glicólisis, por lo que se denominó a este orgánulo glicosoma (Opperdoes y Borst, 1977). Sus características morfológicas lo incluyen en el grupo de los microcuerpos, al que pertenecen glioxisomas y peroxisomas, estos últimos estrechamente relacionados filogenéticamente con los glicosomas (Moyersoen *et al.*,

Introducción

2004). Más del 87% de la proteína total del glicosoma corresponde a las enzimas glicolíticas; el resto lo componen otras enzimas implicadas en diferentes procesos metabólicos (Michels *et al.*, 2006; Oppendoes, 1990).

1.2.1.5. Mecanismos de evasión.

Los protozoos del género *Leishmania*, han desarrollado ciertas estrategias de evasión del sistema inmune que les permite sobrevivir en el hospedador. Desde el momento de su inoculación, deben ser capaces de evadir la respuesta inmune innata; posteriormente deben desarrollar mecanismos para sobrevivir a la acción de las enzimas lisosomales, por remodelación del fagolisosoma, anteriormente mencionado, y a su vez interferir con los mecanismos de inmunidad antígeno específica, cuyo resultado final es la activación del macrófago y producción de metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno, modulando las vías de señalización intracelulares y la producción de citoquinas implicadas en dicho proceso, como desencadenantes de la activación celular (Antoine *et al.*, 2004). En la tabla I.5. se detallan estos mecanismos de evasión:

Tabla I.5. Mecanismos de represión de la activación del macrófago y evasión de la respuesta oxidativa por *Leishmania*.

Estrategia de evasión	Mecanismo empleado
Evasión de la respuesta inmune innata (Olivier <i>et al.</i> , 2005)	LPG evita la inserción del complejo de ataque a la membrana (MAC) C5b-C9. Gp63 actúa sobre C3bi dando lugar a su forma inactiva iC3b, favoreciendo la opsonización e internalización
Modulación de las vías de señalización celular (Kima, 2007)	Cambios en los niveles de fosforilación de tirosinas, especialmente de las MAP quinasas con supresión de señales proinflamatorias y liberación de IL-10. Inhibición de la producción de otras citoquinas como IL-1, TNF α e IL-12.
Inducción de arginasa (Wanaseen y Soong, 2008)	Aumento de poliaminas que favorece la replicación y persistencia de los parásitos.
Disminución de intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno (Gregory y Olivier, 2005; Perez <i>et al.</i> , 2006)	Inhibición de la actividad de la óxido nítrico sintasa 2. Moléculas de superficie LPG y Gp63 inhiben la producción de ROS.
Represión de la presentación antigénica (Gregory y Olivier, 2005)	Promastigotes de <i>L. donovani</i> inhiben la inducción de MHC de clase I y II. Amastigotes de <i>L. amazonensis</i> obstaculizan el procesamiento de antígeno a través de MHC II, así como los niveles del mismo.

1.2.1.6. Control de la enfermedad.

A) Actuaciones sobre el reservorio y vector.

La leishmaniasis es una zoonosis, excepto en núcleos de alta densidad humana como India y China, donde es considerada como antroponosis. El control de los reservorios puede abordarse desde diferentes frentes, aunque se centra principalmente en el perro como principal reservorio doméstico. La Organización Mundial de la Salud recomienda el control veterinario de todos los perros domésticos y el sacrificio de aquellos que estén infectados (Alvar *et al.*, 2004), a pesar de su poca aceptación social. La quimioterapia en el perro supone curación clínica pero no parasitaria. El control sobre el vector se realiza mediante fumigación con insecticidas tanto en el ámbito doméstico como en el peridoméstico, utilización de mosquiteras y de collares repelentes en el perro que previenen de la picadura del mismo (Alexander y Maroli, 2003). Debido al escaso éxito de estas medidas, y a que todavía no existe una vacuna eficaz en el mercado, actualmente la línea de defensa se basa en el tratamiento quimioterapéutico del paciente.

B) Vacunas.

El desarrollo de vacunas contra *Leishmania* se divide arbitrariamente en tres grandes grupos dependiendo de la naturaleza y producción del antígeno (Khamesipour *et al.*, 2006; Palatnik-de-Sousa, 2008):

- Vacunas de primera generación. Consisten en la inoculación de parásitos enteros vivos o muertos. La inoculación de parásitos vivos recibe el nombre de leishmanización (LZ) (Nadim *et al.*, 1983), y sólo es eficaz frente a infecciones producidas por especies del complejo *major*, la más benigna de las leishmaniasis, eficaz y utilizada como vacunación en Oriente Próximo en los años 70 y 80 con promastigotes de *L. major*. En la mayoría de los casos las úlceras producidas eran similares a las de la infección natural e incluso provocaba en ciertos casos una reactivación de la enfermedad por lo que se detuvo este tipo de vacunación (Khamesipour *et al.*, 2006).
- Vacunas de segunda generación. Consiste en la inoculación de parásitos atenuados, modificados genéticamente o de antígenos purificados. También incluye la inoculación de bacterias o virus que expresen un antígeno de *Leishmania* (Palatnik-de-Sousa, 2008). Recientemente se ha evaluado la antigenicidad proteínas de unión a ARNm de la familia PUF de *L. infantum* frente a suero de hámster con leishmaniasis

Introducción

visceral, con resultados prometedores de las mismas como posibles candidatos a vacunas (Folgueira *et al.*). En Brasil se ha aprobado la vacuna basada en el ligando del receptor de fucosa-manosa (Leishmune[®]) (Dantas-Torres, 2006) para el tratamiento de la leishmaniasis visceral canina.

- Vacunas de tercera generación. Se trata de vacunas de ADN, consisten en la inoculación de un plásmido de expresión eucariota con el gen clonado de un determinado antígeno. La primera vacuna de este tipo fue un plásmido portador de un fragmento de Gp63 (Xu y Liew, 1994). Otras de las vacunas empleadas se basan en construcciones con el antígeno LACK (*Leishmania* homologue for receptors for activated C Kinase) y con cisteína proteinasas A y B (Khamesipour *et al.*, 2006).

C) Quimioterapia.

En la actualidad existe un conjunto de fármacos disponibles relativamente eficaces para el tratamiento de la leishmaniasis. Sin embargo no están exentos de inconvenientes; resistencias al medicamento, toxicidad, y aparición de recidivas:

- Antimoniales orgánicos pentavalentes. Hasta hace pocos años eran los fármacos de primera elección. Las dos formas utilizadas son el antimonio de meglumina (Glucantime[®]) y el estibogluconato sódico (Pentostam[®]), ambas de administración intravenosa. Para que el fármaco sea activo se requiere la reducción del estado de oxidación Sb^{5+} a Sb^{3+} , siendo la forma trivalente responsable de la toxicidad del fármaco y de sus efectos secundarios adversos. La reducción tiene lugar tanto en el macrófago (Carter *et al.*, 2006) como en el amastigote (Zhou *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2004). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la reducción de la capacidad redox del parásito, esencialmente por depleción de los niveles de GSH y TSH inducidos por Sb^{3+} (Wyllie *et al.*, 2004) e inhibición de la tripanotona reductasa que conduce a la muerte por apoptosis (Sudhandiran y Shaha, 2003).

Los compuestos antimoniales actúan de manera eutímica, es decir, sinergizan con la respuesta inmune celular protectora, al disminuir la carga parasitaria de *Leishmania*, con reversión de una respuesta inmune permisiva frente a la infección en protectora (Murray, 2000).

- Pentamidina. Se utiliza como terapia de sustitución en los casos más resistentes a antimoniales pentavalentes, pero por su toxicidad su uso es muy restringido, sólo utilizado como terapia de mantenimiento en pacientes con VIH. Su formulación liposomal, o nuevos análogos de la misma mejoran su índice terapéutico (Croft *et al.*, 2006)

Introducción

- Anfotericina B. Es un antibiótico poliénico obtenido a partir del actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Su acción letal se basa en la permeabilización selectiva de la membrana plasmática del patógeno, por su interacción preferente con el ergosterol, sobre el colesterol, presente en la membrana de las células de mamífero (Ramos *et al.*, 1996). Sus formulaciones lipídicas coloidal (Amphocil®) o en complejos lipídicos (Albect®) y especialmente la liposomal (Ambisome®), la convierten en el actual tratamiento de elección para leishmaniasis visceral en zonas con alta resistencia a antimoniales orgánicos en India y Etiopía. No es útil en el caso de las leishmaniasis cutáneas y mucocutáneas (Croft *et al.*, 2006). Su administración intravenosa, la duración del tratamiento, los importantes efectos adversos, excepto en sus formulaciones lipídicas y el elevado coste del Ambisome son sus principales inconvenientes (Croft y Yardley, 2002; Vanlerberghe *et al.*, 2007). Hasta la fecha, sólo se han citado casos de resistencia a anfotericina en laboratorio bajo crecimiento del parásito bajo presión continua del fármaco, que cursa con cambios cualitativos y cuantitativos de esteroides de la membrana plasmática (Croft *et al.*, 2006). No obstante no se han registrado aislados clínicos resistentes.
- Paramomicina. Se trata de un aminoglicósido catiónico. En bacterias actúa mediante unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano con inhibición de la síntesis de proteínas, pero la extrapolación a *Leishmania* como mecanismo de acción no es trivial. En *Leishmania* se ha observado disfunción mitocondrial (Croft *et al.*, 2006). Debido a que su uso aún no está extendido no existen casos de resistencia; la administración es tanto tópica como por vía parenteral. En leishmaniasis visceral en India el porcentaje de curación es similar al obtenido con anfotericina B (Sundar *et al.*, 2007).
- Azoles. Fueron desarrollados y utilizados como antifúngicos. Inhiben la ruta biosintética del ergosterol (Croft *et al.*, 2006), con alteración estructural de las membranas celulares. Los azoles más comunes ensayados en *Leishmania* son fluconazol, ketoconazol e itraconazol (Roberts *et al.*, 2003).
- Sitamaquina WR6026. (4-metil-6-metoxi-8-aminoquinolina, lepidina). Posee un amplio espectro de acción sobre protozoos. Se encuentra en ensayos clínicos en fase II b en el tratamiento de la leishmaniasis visceral (Jha *et al.*, 2005; Wasunna *et al.*, 2005), por lo que no hay resistencias descritas. El mecanismo de acción no es totalmente esclarecido, interacciona con los fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática del promastigote (Duenas-Romero *et al.*, 2007), e induce pérdida del potencial interno mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas (Vercesi y Docampo, 1992; Vercesi *et al.*, 2000), donde se acumula; sin embargo mutantes deficientes en acidocalcisomas son igualmente susceptibles (Lopez-Martin *et al.*,

Introducción

2008).

- Miltefosina (hexadecilfosfolina) y alquil-lisofosfolipidos (ALPs). En su origen fueron desarrollados como análogos del factor activador de plaquetas PAF (*platelet activating factor*) para su uso como antitumorales (Brachwitz y Vollgraf, 1995; Runge *et al.*, 1980). Su actividad leishmanicida sobre *L. donovani* fue descrita por primera vez en 1987 (Achterberg y Gercken, 1987; Croft *et al.*, 1987). En marzo del 2002 la miltefosina fue aprobada como fármaco contra la leishmaniasis visceral en India y comercializada bajo el nombre de Impavido® (Zentaris, Alemania) (Sindermann *et al.*, 2004). Sus ventajas radican en su administración oral y escasos efectos secundarios, así como su eficacia de curación en India, superior al 95%, en pacientes con leishmaniasis visceral, incluso frente a fracaso previo con antimoniales (Jha *et al.*, 1999; Sundar *et al.*, 1998). Los efectos secundarios descritos fueron trastornos gastrointestinales, y cierta actividad teratogénica en ratones, que desaconseja su empleo en mujeres embarazadas o en edad fértil sin tratamiento anticonceptivo (Murray, 2000).

Las resistencias descritas hasta ahora (únicamente *in vitro*) se basan en una acumulación defectuosa del fármaco, causadas por mutación en su translocador (LdMT), una ATPasa tipo-P de la subfamilia de las aminofosfolípido-translocasas y su subunidad reguladora. Con menor importancia la resistencia se ha asociado a bombas de eflujo (Perez-Victoria *et al.*, 2003; Perez-Victoria *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2006). Miltefosina induce apoptosis en el parásito (Verma *et al.*, 2007), sus dianas son diversas, origina disfunción mitocondrial en *Leishmania* con reducción del potencial electroquímico mitocondrial (Luque-Ortega y Rivas, 2007), así como la inhibición de la síntesis de éter-lípidos e inversión en la relación fosfatidilcolina:fosfatidiletanolamina de la membrana plasmática (Rakotomanga *et al.*, 2007)

- Inmunoterapia. La curación de la enfermedad se asocia a una respuesta Th1 con producción mayoritaria de IL-12 e IFN- γ en ratones resistentes a la enfermedad (Rogers *et al.*, 2002). Una estrategia alternativa al tratamiento de la leishmaniasis consiste en la potenciación de los mecanismos inmunes protectores del hospedador, mediante activadores del sistema inmune que potencian la respuesta Th1 frente a la Th2. Entre ellos los más destacados son BGN (Cabrera *et al.*, 2000), muramil dipéptido (Adinolfi *et al.*, 1985), glucano (Avila *et al.*, 1982), tuftsina (Cillari *et al.*, 1994), proteína A (Ghose *et al.*, 1999), tucaresol (Smith *et al.*, 2000), o imiquimod sólo o en combinación con itraconazol en el tratamiento de leishmaniasis cutánea (Al-Mutairi *et al.*, 2009). Otra estrategia es la combinación de antimoniales con IFN- γ , como citoquina Th1, con aceleración de la eliminación de los parásitos y reducción del periodo de tratamiento (Murray, 2000).

1.2.2. *Staphylococcus aureus*.

1.2.2.1. Características microbiológicas.

El género *Staphylococcus* fue descrito por Ogston en 1883 (Ogston 1883), el derivado del griego *staphylé* ("en racimo de uvas"), por su morfología en cultivo. Son cocos Gram-positivos, de 0.5-1.0 μm de diámetro, inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas y generalmente no capsulados. El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, compuesta por 35 especies y 17 subespecies, entre ellas, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleferi*, *S. warneri*, y *S. saprophyticus* son agentes etiológicos de infecciones en humanos. *S. aureus* es la especie con mayor patogenicidad y virulencia para el hombre, aunque también forma parte de la microbiota de piel y mucosas.

Sus características diferenciales son: su tolerancia halofílica; síntesis de carotenoides; coagulasa, catalasa y ADNasa positivo; y fermentación del manitol.

1.2.2.2. Epidemiología.

S. aureus es un patógeno oportunista que forma parte de la microbiota humana del 30-50% de la población, por ello, el hombre (enfermo o portador) constituye el principal reservorio del microorganismo. Históricamente, se ha considerado como uno de los agentes infecciosos nosocomiales más importantes (Palavecino, 2007), en herida quirúrgica (10-28%), bacteriemias (10-21%) generadas a partir de catéter, y la neumonía (15-40%), principalmente en enfermos bajo ventilación mecánica (Pujol *et al.*, 1994; Rodríguez-Bano *et al.*, 2009). Sin embargo, en los últimos años las infecciones por *S. aureus* comunitarios han adquirido gran relevancia en clínica (Millan *et al.*, 2009), que varían desde infecciones leves de piel y partes blandas (Chambers y Deleo, 2009) hasta casos graves de neumonía necrotizante o sepsis (Zetola *et al.*, 2005). *S. aureus* posee una alta capacidad intrínseca de adquisición de resistencias, tanto por mutación como por transferencia horizontal de genes (Chambers y Deleo, 2009). Las infecciones causadas por *S. aureus* multirresistentes han sufrido una expansión a nivel mundial, apareciendo brotes incluso en países donde su prevalencia era casi inapreciable (Larsen *et al.*, 2007; Stam-Bolink *et al.*, 2007), constituyendo una grave amenaza sanitaria global.

Introducción

1.2.2.3. Resistencia a antibióticos en *S. aureus*.

A) Evolución de la resistencia en *S. aureus*

S. aureus fue el primer microorganismo donde se describió la inducción de resistencia a antibióticos. La utilización terapéutica de la penicilina iniciada en la década de los 40 fue condujo al aislamiento de las primeras cepas resistentes a la misma (Barber y Mainprise, 1947). Idéntico proceso sucedió para otros antibióticos y en 1957 muchas cepas de *S. aureus* eran multirresistentes a penicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloramfenicol y eritromicina (Shanson, 1981). En 1959 se introduce la meticilina, una penicilina semisintética no degradada por β -lactamasas, efectiva hasta 1961, cuando Jevons y Knox aíslan en Inglaterra las primeras cepas resistentes a meticilina (Jevons, 1961). Dos años después aparece el primer brote epidémico de infección hospitalaria por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en el Reino Unido (Jevons *et al.*, 1963), y a todos los β -lactámicos, incluidas las cefalosporinas y carbapenemes. Respecto a los aminoglicósidos, las primeras cepas resistentes se detectaron en 1959 en Estados Unidos, y en los años 70 en Europa (Crossley *et al.*, 1979). A finales de los años 80 se describen multiresistencias a cloramfenicol, tetraciclina, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Schaefer, 1989). Actualmente la vancomicina es el tratamiento de elección frente a estas cepas multirresistentes, pero su uso excesivo en los últimos años ha originado cepas SARM con resistencia intermedia (VISA) y total (VRSA) a vancomicina (Appelbaum, 2006), con la consiguiente alarma clínica.

La tabla I.6 resume los mecanismos de resistencia de *S. aureus* a los antibióticos empleados en clínica y los genes asociados a dichas resistencias.

Introducción

Tabla 1.6. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *S. aureus* y genes asociados.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Genes de resistencia	Mecanismo de resistencia	Referencias
β-lactámicos	Inhibición de la síntesis del peptidoglicano.	<i>blaZ</i> <i>mecA</i>	Hidrólisis enzimática del núcleo β-lactámico. Baja afinidad para PBPs.	(Schmitz <i>et al.</i> , 1999a) (Hartman y Tomasz, 1984)
Aminoglucósidos	Inhibición de la síntesis de proteínas. (Subunidad 30S).	<i>aacA-aphD</i> , <i>aadA</i> , <i>aadD</i> , <i>aphA</i> , <i>aphC</i> , <i>spc</i> , <i>strA</i>	Acetilación o adenilación del antibiótico	(Zhu <i>et al.</i> , 2007)
Cloramfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas. (Subunidad 50S).	<i>cat</i>	Acetilación del antibiótico	(Parent y Roy, 1992)
Fluoroquinolonas	Inhiben la replicación del ADN (ADN girasa).	<i>gyrA/gyrB</i> <i>norA</i> <i>grlA</i> (ó <i>parC</i>)	Mutaciones en los genes de la ADN girasa. Bombas de expulsión. Mutaciones en el gen de la ADN topoisomerasa IV.	(Schmitz <i>et al.</i> , 1999b)
Ácido fusídico	Inhibición de la síntesis de proteínas. (Factor de elongación G)	<i>fusA</i> / <i>fusB</i>	Alteración del factor de elongación G / Disminución de la permeabilidad	(O'Neill <i>et al.</i> , 2007)
Glucopéptidos	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	Sistema de dos componentes Van R/Van S	Incremento de síntesis de peptidoglicano y secuestro por la pared celular	(Hanaki <i>et al.</i> , 1998; Hong <i>et al.</i> , 2008)
Macrólidos, lincosamidas	Inhibición de la síntesis de proteínas. (subunidad 50S)	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> . <i>mrsA</i> .	Metilación de ARNr. Bombas de expulsión.	(Zhu <i>et al.</i> , 2007)
Mupirocina	Inhibición de la síntesis de proteínas. (Isoleucil-ARNt-sintetasa)	<i>mupA</i>	Mutación de la isoleucil-ARNt-sintetasa.	(Patel <i>et al.</i> , 2009)
Tetraciclinas	Inhibición de la síntesis de proteínas (Subunidad 30S).	<i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i>	Bombas de expulsión. Protección ribosomal.	(Ardic <i>et al.</i> , 2005)
Trimetoprin	Inhibición de la síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>dfrA</i>	Obtención alternativa de folato por una hidrofolato reductasa	(Weigel <i>et al.</i> , 2003)
Rifampicina	Inhibición de la síntesis de proteínas (ARN polimerasa)	<i>rpoB</i>	Mutación de la ARN polimerasa	(Aubry-Damon <i>et al.</i> , 1998)

Introducción

B) Evolución de las cepas SARM.

Hasta el año 1990 las infecciones por SARM se restringían al ámbito hospitalario, con mayor incidencia en pacientes de riesgo. En la actualidad SARM aparece en el ambiente extrahospitalario, en personas con reciente hospitalización o que han permanecido en contacto con pacientes, que actúan como portadores de SARM, en la comunidad. A finales de 1990 se publicaron los primeros casos de colonización y/o infección por SARM comunitarios (SARM-CO) en Estados Unidos en niños no relacionados con el ámbito sanitario y sin factores de riesgo típicos asociados a dicha infección (Herold *et al.*, 1998). En la actualidad su diseminación es global (Fridkin *et al.*, 2005; Manzur *et al.*, 2008; Turnidge y Bell, 2000; Witte *et al.*, 2004). Algunos autores denominan a tales aislados cepas hipervirulentas o altamente transmisibles, capaces de infectar individuos sanos (Kobayashi y DeLeo, 2009). Las bases moleculares de tal hipervirulencia no se conocen con detalle, con gran controversia respecto a sus factores de virulencia en las mismas. Se ha postulado que la toxina LPV, presente en el 77% de los aislamientos de CO-SARM (Naimi *et al.*, 2003), podría servir de marcador molecular de las mismas.

1.2.2.3. Patogenia y factores de virulencia.

El establecimiento o no de la infección por *S. aureus* dependerá tanto de los factores de virulencia bacterianos, como del estado inmunológico del hospedador. En la acción patógena de la bacteria intervienen los componentes de la pared celular, la producción de enzimas y toxinas que favorecen la invasión y diseminación tisular, y la capacidad de multiplicación de la misma en el hospedador.

A) Componentes de la pared celular.

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer una gruesa pared extracelular cuyo componente principal es el peptidoglicano, que sirve de anclaje a una amplia variedad de moléculas; ácidos teicoicos, ácidos teicurónicos, polifosfatos, carbohidratos y proteínas. La función principal de la pared celular es la de protección frente a la lisis tanto mecánica como osmótica, actuando como exoesqueleto que protege a la bacteria del medio (Navarre y Schneewind, 1999). Los componentes de la pared que actúan como factores de virulencia son descritos a continuación:

Introducción

- **Peptidoglicano.** Es el componente principal de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Está formado por un pentapéptido unido a una cadena oligosacáridica, compuesta por unidades repetitivas del disacárido N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas entre sí mediante enlaces β -1,4. La cadena polisacáridica está muy conservada en todas las Gram-positivas, en contraposición a la gran variabilidad del péptido entre especies. El peptidoglicano es esencial en el mantenimiento de la integridad celular. Actúa como endotoxina proinflamatoria, induciendo la producción de citoquinas (TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8) en monocitos y macrófagos (Fournier y Philpott, 2005).
- **Ácidos teicoicos.** Pueden encontrarse unidos al ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano o a los lípidos de la membrana citoplasmática de la bacteria, recibiendo en este caso el nombre de ácidos lipoteicoicos (ALT) (composición mostrada en la fig. I.10). Se trata de polímeros con alta densidad de carga negativa, que intervienen en: balance de cationes en la superficie celular, división celular y regulación de la autólisis del peptidoglicano (Fischer, 1988), así como en la regulación de la respuesta inflamatoria; ALT de *S. aureus* provoca secreción de citoquinas de monocitos y macrófagos (TNF α , IL-1, IL-10, IL-12, IL-8, factor del complemento 5a, MCP-1, MIP-1 α , y GM-CSF), los sustituyentes de D-Ala en el ácido teicoico juegan un papel primordial, ya que su hidrólisis reduce significativamente la inducción de las citoquinas citadas (Fournier y Philpott, 2005).

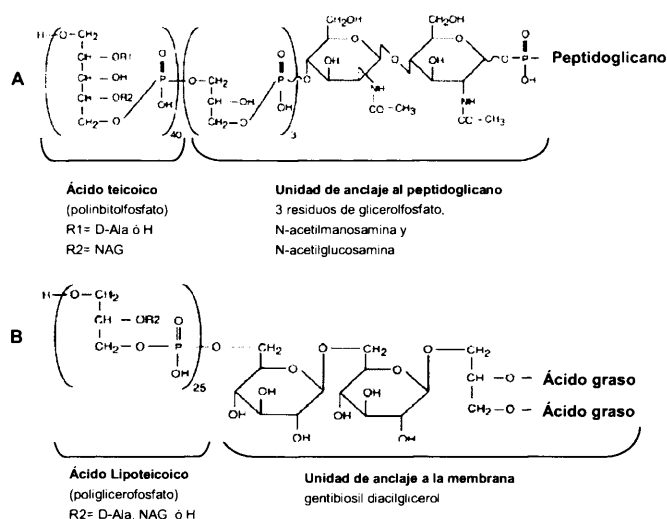


Figura I.10. Estructura del ácido teicoico (A) y lipoteicoico (B) de *S. aureus*. NAG= N-acetilglucosamina. Modificado de Fournier B. y Philpott D. 2005.

Introducción

- Proteínas. La pared celular de *S. aureus* cuenta con múltiples proteínas unidas covalentemente al peptidoglicano y que cumplen diferentes funciones: i) adhesión del microorganismo (proteínas de unión a colágeno o fibronectina), ii) agregación bacteriana (coagulasa ligada o factor de agregación bacteriano), iii) proteína A específica de *S. aureus* (SPA), implicada en la inhibición de la opsonización y fagocitosis (Navarre y Schneewind, 1999).
- Cápsula externa o glicocálix. Es la capa más externa de la pared celular, de naturaleza polisacáridica e implicada en la adherencia de la bacteria. Su presencia aumenta la virulencia por evitar la fagocitosis. Hay 11 serotipos capsulares diferentes, de los cuales los serotipos 5 y 8 son los más comunes en las infecciones.

B) Enzimas.

Actúan en el entorno local del foco de infección, las principales son:

- Catalasa. Degrada el peróxido de hidrógeno y protege al microorganismo durante la fagocitosis.
- Coagulasa. Se encuentra bajo dos formas; la coagulasa ligada y la coagulasa libre o extracelular, ambas intervienen en la formación de coágulos, por conversión del fibrinógeno en fibrina, favoreciendo los procesos sépticos y la formación de abscesos. Existe una fuerte correlación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa (Larkin *et al.*, 2009).
- Hialuronidasa. Degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo, facilitando así la propagación de la infección (Larkin *et al.*, 2009).
- Penicilinasas. Es una β -lactamasa que inactiva la penicilina mediante la hidrólisis del anillo β -lactámico. En la actualidad es producida por la práctica totalidad las cepas de *S. aureus* (Schmitz *et al.*, 1999a).
- Proteinasas. La proteasa V8 y la aureolisina contribuyen a la resistencia de la bacteria al sistema inmune mediante la hidrólisis de péptidos antimicrobianos humanos, incluyendo LL-37 (Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004).
- Otras enzimas. La mayoría de las cepas de *S. aureus* sintetizan otras enzimas adicionales que favorecen su invasión y diseminación (lipasas, nucleasas y estafiloquinasas) (Larkin *et al.*, 2009).

C) Toxinas.

Determinadas cepas de *S. aureus* producen exotoxinas con acción en zonas distantes al foco infeccioso (Dinges *et al.*, 2000). Las más importantes son:

- Hemolisinas. Producidas por la mayoría de las cepas, se han descrito 4 tipos diferentes (α -, β -, γ - y δ -); la más frecuente es la α -hemolisina, también conocida como toxina- α , causa destrucción de las células del hospedador; células epiteliales, eritrocitos, fibroblastos y monocitos. La toxina purificada e inyectada en modelos animales es letal. La virulencia es proporcional al nivel de expresión de la toxina por el correspondiente aislado (Chambers y Deleo, 2009).
- Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV). En 1932 Pantón y Valentine describieron una toxina de *S. aureus* letal en conejo distinta de las hemolisinas conocidas hasta la fecha (Pantón y Valentine, 1932). Posteriormente, LPV ha sido asociada a infecciones graves de piel y neumonías necrotizantes. Está compuesta por dos subunidades LukF-PV y LukS-PV, que se insertan en la membrana plasmática de células mieloides formando poros con alteración de la permeabilidad y, como consecuencia, la destrucción celular (Kobayashi y DeLeo, 2009).
- Toxinas exfoliativas o epidermolíticas. Se han identificado los serotipos A y B, ambos poseen actividad proteolítica y actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, causando el síndrome de la piel escaldada.
- Enterotoxinas. Se han descrito 8 serotipos estafilocócicos (A-I) siendo el más común el serotipo A. Son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas. Son las responsables de las intoxicaciones alimentarias y cuadros de enterocolitis. Poseen las características inmunomoduladoras propias de los superantígenos (Fraser y Proft, 2008).
- Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1). Anteriormente denominada exotoxina pirogénica C o enterotoxina F. Actúa como superantígeno, induciendo la liberación de citoquinas por macrófagos y linfocitos T en ausencia de antígeno. A baja concentración causa la extravasación en células endoteliales y a mayor concentración es citotóxica (Tristan *et al.*, 2007).
- Péptidos de modulina solubles (PMS). Recientemente se han descrito péptidos asociados a la mayor virulencia de las cepas CO-SARM. Se han dividido en dos grupos; los α , de menor tamaño (20 residuos), y los β (40 residuos), ambos con capacidad de activación y posterior lisis de neutrófilos.(Wang *et al.*, 2007).

Introducción

1.2.2.4. Vacunas en *S. aureus*.

En la actualidad no existe una vacuna eficaz contra *S. aureus*. Se ha empleado una amplia variedad de antígenos (capsulares, proteínas de la pared celular, ácidos teicoicos...) para lograr una vacuna efectiva. La farmacéutica Nabi alcanzó la fase clínica III con una vacuna que combinaba antígenos capsulares (CP5 y CP8) de *S. aureus* con una exoproteína de *Pseudomonas aeruginosa* (ETA), finalmente, al no evitar la bacteriemia, no fue comercializada (García-Lara y Foster, 2009). El fracaso de las vacunas obedece a la multifactorialidad de la virulencia del patógeno. Una vacuna eficaz debería: i) prevenir la adherencia de la bacteria, ii) promover fagocitosis y eliminación de la bacteria, y iii) neutralizar las exotoxinas bacterianas. Por ello las estrategias actuales se basan en la combinación de antígenos. La misma farmacéutica citada inició un estudio en el 2007 combinando CP5, CP8, el componente polisacárido 336 y dos toxinas estafilocócicas (García-Lara y Foster, 2009). Otra estrategia empleada consiste en la inmunización con toxinas inactivas, como la producida por un mutante no tóxico de TSST-1 que protege al conejo frente a la infección (Hu *et al.*, 2003), o la inmunización pasiva por administración de anticuerpos monoclonales generados con un fragmento inactivo de la toxina- α (H35L) que confiere reducción de la mortalidad en un modelo murino (Ragle y Bubeck Wardenburg, 2009).

1.2.3. *Acinetobacter baumannii*.

1.2.3.1. Características microbiológicas.

El género *Acinetobacter* ha experimentado numerosos cambios taxonómicos desde su descripción inicial como *Micrococcus calcoaceticus* en 1911 por Beijerinck, (Peleg *et al.*, 2008). Durante las siguientes décadas otros organismos similares fueron descritos y asignados al menos a 15 géneros y especies diferentes. La asignación del género actual, *Acinetobacter*, derivada del griego *Akinetos* (no móvil), fue propuesta por Brisou y Prévout en 1954 (Brisou y Prévot, 1954), posteriormente Bauman y colaboradores agruparon estas 15 especies bajo el género común *Acinetobacter* (Baumann *et al.*, 1968). Actualmente mediante genotipado se han identificado 33 genoespecies diferentes (Vaneechoutte *et al.*, 1995). Todas se caracterizan por ser coccobacilos Gram-negativos con tamaño 1.0-1.5 μm , no móviles, no fermentadores, aerobios estrictos y oxidasa negativos. Las especies del género *Acinetobacter* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza; han sido aisladas de suelo, agua y vegetales, y en un 25% de la población forman parte de la flora normal de la

Introducción

piel. También se encuentran en la cavidad oral y tracto respiratorio en un 7% de individuos sanos (Peleg *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista clínico las genopecies más relevantes son la 3, la 13TU y la geno especie 2, que corresponde a *Acinetobacter baumannii*. Estas tres especies junto con *A. calcoaceticus* o geno especie 1 (raramente asociada a procesos infecciosos), se incluyen en el denominado complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii*. Son especies muy relacionadas genéticamente y de difícil diferenciación fenotípica (Gerner-Smidt y Tjernberg, 1993), siendo *A. baumannii* la más frecuente en aislamientos de infecciones, con fácil adaptación y supervivencia a diversos ambientes, y fácil desarrollo de resistencias (Cisneros y Rodríguez-Bano, 2002).

1.2.3.2. Epidemiología.

Acinetobacter baumannii es un patógeno oportunista caracterizado por su persistencia en el ambiente hospitalario, tanto en medios inanimados (equipos médicos reutilizables, guantes, camas, sistemas de ventilación, etc) que actúan como reservorios para la colonización de pacientes, como en el personal sanitario (Karageorgopoulos y Falagas, 2008). Se trata por tanto de un patógeno esencialmente nosocomial, con especial incidencia en pacientes inmunodeprimidos de UCIs. Los cuadros clínicos más comunes son neumonía y bacteriemia, además de infecciones de piel en heridas quirúrgicas y quemados, e infecciones del tracto urinario. Con menor frecuencia origina cuadros de meningitis y peritonitis (Karageorgopoulos y Falagas, 2008). Se han descrito casos esporádicos de neumonías y bacteriemias por *A. baumannii* comunitarios en individuos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y en grandes consumidores de tabaco y alcohol (Falagas *et al.*, 2007), pero no en individuos sanos. La preocupación clínica principal es el desarrollo de resistencias del microorganismo durante el tratamiento de la infección, por el agotamiento del número de agentes disponibles.

Las primeros brotes endémicos o epidémicos por *A. baumannii* multirresistentes sucedieron en los años 80 (Beck-Sague *et al.*, 1990; Buisson *et al.*, 1990). En la actualidad, este patógeno causa un número de infecciones nosocomiales superior al de otros BGN en muchos hospitales del mundo, tanto limitadas y esporádicas en forma de brotes endémicos, o bien persistentes, cuya erradicación requiere la aplicación de medidas drásticas y que frecuentemente desencadena epidemias (Landman *et al.*, 2002).

Introducción

1.2.3.3. Resistencia a antibióticos en *Acinetobacter baumannii*.

Acinetobacter baumannii es el paradigma de las bacterias multirresistentes. Tanto la expresión constitutiva de bombas de expulsión, como su membrana externa poco permeable a determinados antibióticos, le confieren resistencia intrínseca a un amplio número de antibióticos. Por otro lado, presenta dos características fundamentales para la adquisición de resistencias múltiples:

1) Su mencionada capacidad de adaptación y de supervivencia en medios inanimados (Musa *et al.*, 1990), característica que favorece la persistencia de la bacteria en el ambiente hospitalario, donde se encuentra sometida a presión antibiótica permanente, con selección de cepas resistentes.

2) La capacidad de adquisición de elementos génicos de otras bacterias (plásmidos, transposones e integrotes). Goldstein y cols. demostraron la presencia de un plásmido en *A. baumannii* que contiene 3 genes de resistencia; el gen que codifica para la β -lactamasa TEM-1 y dos genes codificantes para enzimas modificadoras de aminoglucósidos (APH(3')(5')I y ADD(3'')(9) (Goldstein *et al.*, 1983). Posteriormente Ribera y cols. caracterizaron el transposón portador de los genes *tetR* y *tetA*, de resistencia a tetraciclina. En los últimos años se han publicado numerosos artículos sobre el papel de los integrones como elementos génicos portadores de genes de resistencia a antibióticos en esta bacteria (Gombac *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009). Una parte significativa del genoma de *A. baumannii* (17.2%) se encuentra localizado en 28 islas genómicas demostrando la adquisición de ADN exógeno, 16 de las cuales contienen genes implicados en la virulencia y resistencia (Smith *et al.*, 2007). En la tabla I.7 se recogen los mecanismos de resistencia a los antibióticos y las proteínas y/o genes asociados.

Introducción

Tabla 1.7. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *A. baumannii* y genes y/o proteínas asociados.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Enzimas / Proteínas / Genes	Mecanismo de resistencia	Referencias
β-lactámicos	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.	AmpC OXA51 OXA23 OXA40 OXA58 TEM-1 TEM-2 PER-1 VEB-1 CTXM-2	Carbapenemasas Otras β-lactamasas	(Mak <i>et al.</i> , 2009; Vila <i>et al.</i> , 1993)
Aminoglucósidos	Inhibición de la síntesis de proteínas.	AdeABC AACs ANTs APHs	Sobreexpresión de bombas de expulsión Aminoglicósido acetiltransferasas, Aminoglicósido nucleotidiltransferasas Aminoglicósido fosfotransferasas.	(Nemec <i>et al.</i> , 2004)
Cloramfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas.	<i>CraA</i> APH(3')IV	Bomba de expulsión Cloramfenicol acetiltransferasa	(Roca <i>et al.</i> , 2009) (Vila <i>et al.</i> , 1993)
Flouroquinolonas	Inhiben la replicación del ADN	<i>gyrA</i> / <i>parC</i> AdeABC / AbeM	Mutaciones de los genes de la ADN girasa y ADN topoisomerasa Sobreexpresión de bombas de expulsión.	(Mak <i>et al.</i> , 2009)
Tetraciclinas	Inhibición de la síntesis de proteínas	TetA, TetB, AdeABC TetM	Bombas de expulsión. Inhibición de la unión de Tet al ribosoma.	(Huys <i>et al.</i> , 2005; Mak <i>et al.</i> , 2009)

1.2.3.4. Patogenicidad y virulencia de *A. baumannii*.

La ubicación de *A. baumannii* en una escala de patogenicidad es difícil (Joly-Guillou, 2005); aunque no causa infecciones en individuos sanos, la gravedad de las mismas en individuos inmunocomprometidos le compara con otros microorganismos de alta patogenicidad, incluso se ha denominarlo como “el Gram-negativo SARM” (Rello, 1999). A continuación se describen los principales componentes implicados en la virulencia del microorganismo.

Introducción

A) Componentes de la membrana externa.

- Lipopolisacárido. En la línea celular monocítica humana THP-1 la concentración mínima requerida de LPS para provocar la liberación de IL-8 y producción de TNF- α fue de 0.1 ng/mL y 1.0 ng/mL, respectivamente (Erridge *et al.*, 2007). Otros estudios *in vivo* confirman una capacidad endotóxica del LPS y del lípido A de *A. baumannii* similar a la de otras bacterias patógenas como *Salmonella spp.*. El lipopolisacárido y el lípido A inactivan el sistema de complemento, inducen mitogénesis y aumentan la expresión de TNF- α en linfocitos B (García *et al.*, 1999). El antígeno O sinergiza con el exolipopolisacárido capsular en cepas productoras del mismo, en bloquear el acceso a la membrana externa de componentes del complemento, impidiendo su opsonización (Joly-Guillou, 2005).
- Adhesinas. *A. baumannii* posee fimbrias (*pili*), polisacáridos capsulares, y otros componentes de la membrana externa implicados en su unión a células hospedadoras (Bergogne-Berenzin *et al.*, 2008). Las fimbrias han sido observadas en aislados que hemaglutinan eritrocitos (Sepulveda *et al.*, 1998), y su expresión se asocia a adhesión y patogenicidad (Cevahir *et al.*, 2008).
- Porinas de membrana externa (PME). La función principal de las PME es la de formación de poros que permitan el acceso de moléculas al periplasma. Adicionalmente intervienen en la adhesión a otras células o en la fijación de compuestos bactericidas a la superficie de la membrana, impidiendo la interacción con sus dianas. Sus variaciones estructurales de sus niveles de expresión se relacionan con la resistencia antibiótica del aislado (Vila *et al.*, 2007). *A. baumannii* posee un número de porinas inferior al de otras bacterias Gram-negativas, que explica la baja difusibilidad de los antimicrobianos a través de su ME. En *P. aeruginosa* el coeficiente de permeabilidad a las cefalosporinas es de 2-7 veces mayor que el de *Acinetobacter spp.* (Sato y Nakae, 1991). Por otro lado, *A. baumannii* disminuye los niveles de expresión de determinadas porinas en presencia de antibióticos (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003; Mussi *et al.*, 2005). Las principales porinas descritas en *A. baumannii* son:
 - HMP-AB ("Heat Modifiable Protein"): Se trata de la mayor porina de *A. baumannii* (35.636 Da). Con alta homología con la OmpA de enterobacterias y con la OprF de *P. aeruginosa*, de la familia de las OmpAs, caracterizadas por permitir la entrada de β -lactámicos y sacáridos de hasta 800 Da (Gribun *et al.*, 2003; Nitzan *et al.*, 1999).
 - OmpA: Es un componente estructural de la mayoría de las especies de *Acinetobacter*, pero también es secretada al medio junto con otras proteínas y polisacáridos formando parte de una emulsión que interviene en la adhesión de la

Introducción

bacteria a superficies, formación de *biofilm*, y señalización paracrina (Walzer *et al.*, 2006).

- OmpW: La función de esta porina es desconocida, sin embargo, forma un canal hidrofóbico implicado en transporte de pequeñas moléculas hidrofóbicas a través de la ME (Siroy *et al.*, 2006). Presenta alta homología con la proteína OprG de *Pseudomonas spp.*, cuya expresión depende de las condiciones de crecimiento (temperatura, concentración de Mg^{2+}), y asociada a modificaciones de la estructura del LPS. Se ha sugerido su implicación en la adquisición de hierro. La resistencia en cepas de *P. aeruginosa* se relaciona con los niveles de expresión de OprG (Siroy *et al.*, 2006). En *A. baumannii*, el nivel de expresión de OmpW es mayor en cepas resistentes a colistina (Vila *et al.*, 2007).
- Porinas relacionadas con resistencia a β -lactámicos: En *A. baumannii* existen otras tres porinas cuya expresión se inhibe en presencia de imipenem y como tal, ausentes en cepas resistentes al mismo: Omp 33-36 KDa, CarO de 29 KDa, y una proteína de 43 KDa homóloga de OprD de *P. aeruginosa*. Los poros resultantes regulan el tránsito de carbapenemes (Vila *et al.*, 2007).
- Proteínas de membrana externa reguladoras de hierro (IROMPs): Son proteínas de membrana externa cuya expresión está regulada por los niveles de hierro extracelulares. Su función es la de síntesis y liberación de sideróforos al medio extracelular, actuando como receptores de los complejos hierro-sideróforo y su transporte al interior celular (Goel y Kapil, 2001).
- Sideróforos: Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (600-1000 Da) con grupos funcionales que coordinan los iones Fe^{3+} con especificidad y alta afinidad por Fe^{3+} , compiten por el mismo *in vivo* con la ferri-lactoferrina, la ferritina y la ferri-transferrina y en ambientes terrestres o acuáticos con los hidróxidos férricos (Ratledge, 2007). Son sintetizados y secretados por multitud de bacterias bajo carencia de hierro, y su asimilación es paralela a la capacidad de invasión de los microorganismos. En los aislados clínicos de *A. baumannii* crecidos bajo concentración limitante de Fe^{3+} se detectaron sideróforos tipo catecolato en el sobrenadante de cultivos (Actis *et al.*, 1993). Posteriormente se identificó un nuevo sideróforo en *A. baumannii* ATCC 19606 denominado acinetobactina, cuyos grupos funcionales son catecolato e hidroxamato, con expresión variable en cepas clínicas (Yamamoto *et al.*, 1994).

Introducción

B) Enzimas.

Esterasas, determinadas aminopeptidasas, ureasa y fosfatasa ácida de *A. baumannii* favorecen la colonización, diseminación e inflamación de los tejidos, como tales se consideran factores de virulencia de *A. baumannii* (Bergogne-Berenzin *et al.*, 2008).

1.2.3.5. Alternativas terapéuticas en el tratamiento de cepas multirresistentes.

- Imipenem: Ha sido el antibiótico de elección para infecciones por *A. baumannii*, sin embargo la diseminación de resistencias al mismo ha requerido búsqueda de alternativas terapéuticas (Rahal, 2006), como sulbactam (sólo o combinado con ampicilina), rifampicina y colistina. Se han establecido terapias de combinación buscando sinergias entre diferentes antibióticos y mejorar la eficiencia del tratamiento.
- Sulbactam: Su eficacia es muy alta en infecciones leves y moderadas, no así en infecciones graves donde es frecuente el fallo terapéutico (Corbella *et al.*, 1998; Levin *et al.*, 2003). En un estudio de multicéntrico en España en 2004 se describe que menos de la mitad de los aislados eran sensibles a sulbactam (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2004).
- Rifampicina: Es tan eficaz como imipenem en modelos experimentales de neumonía en ratón (Montero *et al.*, 2004; Wolff *et al.*, 1999). El inconveniente es la rápida aparición de resistencias en monoterapia, y su actuación como componente en terapias de combinación está en evaluación (Pachon-Ibanez *et al.*, 2010), con los mejores resultados con rifampicina-imipenem; rifampicina-colistina no mejoró el resultado de la misma en monoterapia (Montero *et al.*, 2004; Pachon-Ibanez *et al.*, 2010).
- Colistina: El uso clínico de la colistina en el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii* multirresistentes ha resurgido en los últimos años. Su administración intravenosa es eficaz en meningitis (Jimenez-Mejias *et al.*, 2002) e infecciones del sistema nervioso central (Ng *et al.*, 2006). Sin embargo, la mortalidad en neumonías en pacientes ventilados tratados con colistina se eleva al 38% (Garnacho-Montero *et al.*, 2003). Existen ciertas discrepancias entre los resultados de estudios experimentales y los clínicos, en parte debido a su baja capacidad de penetración en tejidos (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2004). Su eficacia mejora en terapias de combinación con rifampicina en neumonía en rata neutropénica (Pantopoulou *et al.*, 2007). El principal inconveniente es su nefrotoxicidad, comprendida entre el 8% y el 36% en tratamientos de infecciones por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* multirresistente,

Introducción

sin embargo los casos de neurotoxicidad descritos son inapreciables (Linden y Paterson, 2006). Recientemente se han reportado casos esporádicos de resistencia a colistina en *A. baumannii* multirresistente; el incremento del uso de este antibiótico en las UCIs podría favorecer el incremento del número de cepas resistentes (Karageorgopoulos y Falagas, 2008). Tal y como se ha mencionado en el apartado 1.1.2.2 la principal estrategia de resistencia a colistina en bacterias Gram negativas consiste en la modificación de su membrana externa, diana de acción del antibiótico, resultando en la reducción de la carga negativa de la ME con disminución de afinidad de colistina por el LPS (véase tabla 1.3.), reguladas por sistemas de dos componentes (apartado 1.1.1.2.). Mutaciones que causan expresión constitutiva de los mismos se han asociado a cepas de *P. aeruginosa* y *S. enterica* resistentes a colistina (Moskowitz *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2007). Previamente, se había demostrado la menor afinidad por PXB del LPS de cepas clínicas de *A. baumannii* resistentes colistina (Saugar *et al.*, 2006). A partir del genoma de *A. baumannii* se sabe que no posee el sistema PhoPQ, ni los genes codificantes de las enzimas implicadas en la incorporación de Ara4N. Recientemente se han descrito mutaciones en PmrAB asociadas a cepas resistentes a PXB, con expresión constitutiva de *pmrA*, que sugiere como modificación más probable la incorporación de EtN al LPS (Adams *et al.*, 2009).

- Combinación de antibióticos: En *A. baumannii* el imipenem combinado con kanamicina no produjo resultados favorables (Bernabeu-Wittel *et al.*, 2005; Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2000). En bacteriemias por *A. baumannii* multirresistente en Taiwan la combinación de imipenem más ampicilina-sulbactam (30% mortalidad) fue superior a la combinación con amikacina (50% mortalidad) o imipenem en monoterapia (58.3% mortalidad) (Kuo *et al.*, 2007). Otra alternativa es la combinación de amikacina con doxiciclina, la sinergia fue demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos experimentales (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2000), aunque se ha documentado resistencias a las mismas (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Evaluación de la potencialidad terapéutica de péptidos antibióticos activos en membrana sobre tres patógenos con creciente relevancia clínica causada por el desarrollo de multirresistencia, y prototipos de tres diferentes arquitecturas de membrana biológica: *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Leishmania sp.* .
2. Modulación de la actividad microbicida e índice terapéutico de péptidos antibióticos por modificaciones estructurales muy localizadas y escasamente exploradas: trimetilación de lisinas en ϵ -amino en péptidos cecropina A-melitina, y análogos de Phe en el giro β II de Gramicidina S.
3. Ejemplo de la proteómica para la elucidación de los mecanismos de adaptación biológica y su coste biológico en resistencia clínica a péptidos antibióticos. Resistencia a colistina como último recurso terapéutico frente a *A. baumannii*.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.**3.1 MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL DE LABORATORIO.**

Para facilitar la lectura de los métodos empleados en la presente tesis todos los reactivos y medios de cultivo se presentan en tabla (tabla M.1.), así como el material y equipos de laboratorio (tabla M.2.).

Tabla M.1. Medios de cultivo y reactivos.

Medio de cultivo / Reactivo	Casa comercial
Ácido bicínico	Thermo Scientific, Pierce BCA Protein Assay Kit
ADNasa I grado II	Roche Diagnostics
Agar bacteriológico	Pronadisa, Torrejón de Ardoz, Madrid, España.
ARNasa	Sigma-Aldrich, Madrid, España.
ASB-14	Calbiochem, La Jolla, CA.
Bacto peptona	Becton and Dickinson, Sparks, MD.
Bacto triptona	Becton and Dickinson, Sparks, MD.
Bisoxonol	Invitrogen, Barcelona, España
Colistina (polimixina E)	Sigma-Aldrich, Madrid, España
D(+)-Glucosa	Merck, Darmstadt, Alemania
DDSA	Tousimis research corporation, Rockville, MD.
Disc3(5)	Invitrogen, Barcelona, España.
Discos de antibiogramas	Oxoid, Basingstoke, Inglaterra.
DMNPE-D-luciferina	Invitrogen, Barcelona, España.
DMP 30	Tousimis research corporation, Rockville, MD.
Epon 812	Tousimis research corporation, Rockville, MD.
Extracto de levadura	Pronadisa, Torrejón de Ardoz, Madrid, España.
Geneticina	GIBCO, Invitrogen, CA.
Gentamicina	Schering-Plough, Kenilworth, N.J.
Glutamina	Sigma-Aldrich, Madrid, España.
Glutaraldehído	Merck, Darmstadt, Alemania.
Hemina bovina	Sigma-Aldrich, Fluka, Madrid, España.
IPG tampón pH 3.0-10.0	GE Healthcare, Madrid, España.
IPG tampón pH 4.0-7.0	GE Healthcare, Madrid, España.
Lisostafina	Sigma, ST Louis, MO
M199	GIBCO, Invitrogen, CA.

Material y métodos

Medio de cultivo / Reactivo	Casa comercial
Medio HL5	Foremedium, Hunstanton, Inglaterra.
MNA	Tousimis research corporation, Rockville, MD.
MTT	Sigma-Aldrich, Fluka, Madrid, España.
Mueller-Hinton II broth cation adjusted	Oxoid, Basingstoke, Inglaterra.
Óxido de propileno	Sigma-Aldrich, Fluka, Madrid, España.
Polimixina B	Sigma-Aldrich, Madrid, España.
<i>Ready-prep 2D cleanup</i>	BioRad, Laboortories Inc.
RPMI 1640	GIBCO, Invitrogen, CA.
RPMI 1640 sin rojo fenol	GIBCO, Invitrogen, CA.
Sangre desfibrinada de carnero	Biomedics, Madrid, España.
SDS	Sigma-Aldrich, Fluka, Madrid, España.
SFBI	PAA Laboratorios GMBH, Pasching, Austria.
TBP	BioRad, Laboortories Inc.
Tetróxido de osmio	Sigma-Aldrich, Fluka, Madrid, España.
Tripsina	Promega, Alcobendas, España.
Tripticasa	Becton and dickinson, Sparks, MD.
Triton X-100	Calbiochem, La Jolla, CA.
Unicilina	Laboratorios ENR, Barcelona, España.

Tabla M.2. Equipos y material de laboratorio.

Equipo / Material	Casa comercial
Citómetro Coulter XL EPICS	Beckman Coulter
Digestor <i>Multiscreen vacum manifold</i>	Millipore Ibérica, Madrid, España.
Espectrómetro de masas MALDI TOFF <i>Voyager DE-STR</i>	Applied Biosystem, Forter City, CA
Espectrómetro de masas LC-MS/MS <i>Q-Star Pulsar</i>	Applied Biosystem, Forter City, CA
Espectrofluorímetro de placas Polarstar Galaxy	BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania
Espectrofluorímetro de placas Varioskan Flash	Termo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia.
Espectrofluorímetro Hitachi F2000	McKinley Sparta, NJ.
Frascos de cultivo falcon	Becton dickinson Franklin Lakes, NJ.
Hybaid Ribolyser	Hybaid, Teddington, Inglaterra.
Lector de placas ELISA. Mod. 450.	BioRad, Laboortories Inc.
<i>Lysing matrix</i> B tubos	Q-BIOgene. Carlsbad, CA.
Medio de inoculación GN2	BioLog, Hayward, CA.
Microcentrifuga Hettich Mikro 200	DJB Labcare, Buckinghamshire, Inglaterra.
Microscopio electrónico de transmisión JEOL-1230.	Jeol, Akishima, Japón.

Material y métodos

Equipo / Material	Casa comercial
Placa de micocultivo de 24 y 96 pocillos	Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ.
Placas de 96 pocillos GN2	BioLog, Hayward, CA.
Prensa de Fench	Thermo Scientific, Madrid, España.
Rejillas de cobre de trama G-200	Fedelco, Madrid, España.
Rotor de ángulo fijo Sorvall SS-34	Thermo Scientific, Madrid, España
Rotor de ultracentrifuga Beckman 70.1Ti.	Beckman Coulter
Ultracentrifuga Beckman XL-90	Beckman Coulter

3.2. CULTIVO DE CÉLULAS.

3.2.1. Bacterias.

La cepa de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (cedida por el Profesor M. López-Brea Hospital de la Princesa, Madrid) fue cultivada en medio LB (170 mM NaCl, 1% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, pH = 7.2) a 37°C en agitación. A partir de dicha cepa se generó su derivada isogénica resistente a 32 µM de colistina (polimixina B) (ver apartado 3.3), *A. baumannii* ATCC 19606R^C, que se cultivó en medio líquido Mueller-Hinton II (MHII) pH 7.2 a 37°C en agitación y en presencia de 32 µM de colistina. Las cepas de *Staphylococcus aureus* CECT 240 y las 12 cepas clínicas aisladas de comunidad (cedidas por el Dr. Germán Bou, Hospital Juan Canalejo, La Coruña) así como la cepa de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 fueron cultivadas a 37°C en medio LB pH 7.2.

Las cepas se mantuvieron a -80°C en viales de congelación de 1.5 mL, obtenidos de cultivos de 20 mL de bacterias en fase de crecimiento exponencial, alicuotados en tubos eppendorf, centrifugados en microfuga (13000 x g, 2 min) y lavados dos veces con 1.5 mL de solución salina estéril Hanks (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 4.2 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 4.1 mM NaHCO₃, pH = 7.2), finalmente fueron resuspendidos en 1.5 mL de medio de congelación (65% glicerol, 0.1 M MgSO₄, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) y transferidos a viales de congelación que se almacenaron a -80°C. Los inóculos necesarios para generar los cultivos de cada experimento se obtuvieron a partir de dichos stocks.

Material y métodos

3.2.2. Promastigotes de *Leishmania donovani*.

La cepa silvestre 1S2D (Ryan *et al.*, 1993) proporcionada por el profesor Salvatore Turco (Universidad de Kentucky, Lexington) fue cultivada a 25 °C en medio RPMI 1640 pH 6.8, suplementado con 5 mM NaHCO₃, 10 % suero fetal bovino inactivado por calor (SFBI), 2 mM glutamina, 10 µg/mL gentamicina y 100 unidades/mL unicitina. La cepa 3-Luc, que expresa el gen de la luciferasa fue obtenida mediante transfección de promastigotes de la cepa parental 1S2D con el vector pX63NeoLuc, construido en el vector de expresión pX63Neo por inclusión del fragmento de 1892 pb de la secuencia del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*. (Luque-Ortega *et al.*, 2001). Esta cepa fue seleccionada y mantenida en idéntico medio al de la cepa salvaje, salvo por la adición de 30 µg/mL de geneticina.

3.2.3. Amastigotes de *Leishmania pífanoi*.

Los amastigotes pertenecientes a la línea axénica desarrollada por el Dr. A. A. Pan, fueron cultivados en medio M199, suplementado con 20% de SFBI, 5% de tripticasa y 50 µg/mL de hemina bovina. Las células fueron cultivadas a una temperatura de 32°C. (Rainey *et al.*, 1991).

3.2.4. Línea macrofágica murina RAW 264.7.

Macrófagos de la línea monocítica murina RAW 264.7 procedentes de la cepa BALB/c se cultivaron a 37°C en frascos de cultivo de 75 cm² y en el mismo medio descrito para promastigotes de *L. donovani*. (apartado 3.2.2).

3.2.5. Línea celular Ax2 de *Dictyostelium discoideum*.

La cepa de *Dictyostelium discoideum* Ax2 (cedida por la Dra. Teresa Suárez) fue cultivada a 22°C en agitación en medio HL5 hasta fase de crecimiento exponencial (~ 2x10⁶ células/mL). A continuación las células fueron centrifugadas (13000 x g, 1 min, 4°C) y lavadas con medio KK2 (16.5 mM KH₂PO₄, 3.9 mM K₂HPO₄, 2 mM MgSO₄, pH = 6.2), resuspendidas en este mismo medio y cultivadas sobre placas SM-agar (2% agar bacteriológico, 1.5% bactopectona, 7% extracto de levadura, 15% D-glucosa, 9 mM Na₂HPO₄, 3.6 mM KH₂PO₄, pH = 6.8) en presencia de *Klebsiella aerogenes* a 22°C. (Nunez-Corcuera *et al.*, 2008).

Material y métodos

3.3. GENERACIÓN *IN VITRO* DE LA CEPA RESISTENTE A COLISTINA (PXE) DE *Acinetobacter baumannii*.

La cepa de referencia *A. baumannii* ATCC 19606 fue cultivada en medio líquido MH (en agitación, 37°C) en presencia de 2 µM de colistina. Una vez que la velocidad de crecimiento no incrementó en sucesivos cultivos bajo idéntica presión de antibiótico, se procedió a la toma de una alícuota del cultivo en fase exponencial, que se inoculó en medio con una concentración de colistina doble que la anterior, continuando el mismo proceso hasta 32 µM (*A. baumannii* ATCC 19606R^C). Durante las etapas sucesivas de generación de resistencia se aislaron cepas resistentes a diferentes concentraciones de colistina (8 µM, 18 µM, y 22 µM) almacenadas y utilizadas conforme al apartado 3.2.1. Una vez conseguido el nivel máximo de resistencia (32 µM), la cepa se mantuvo durante 2 meses bajo presión constante de antibiótico. Un clon de la misma fue aislado y a partir de este se estableció un stock cuyas alícuotas, preservadas a -80°C, fueron utilizadas en todos los experimentos de esta tesis con *A. baumannii* R^C.

3.4. ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS.

3.4.1. Recolección de parásitos.

Los parásitos fueron recogidos en fase de crecimiento exponencial tardía (~10⁷ parásitos/mL) por centrifugación (1000 x g, 10 min, 4°C en una centrífuga clínica refrigerada). A continuación se lavaron dos veces con solución salina Hanks suplementada con 1% de glucosa (Hanks + Glc) en idénticas condiciones de centrifugación. Tras los lavados, las células fueron resuspendidas a una densidad de 2 x 10⁷ parásitos/mL en este mismo medio para la realización de cada ensayo. Estas condiciones fueron definidas como estándar, y mantenidas a lo largo del resto de experimentos, excepto mención explícita en contra.

3.4.2. Efecto de los péptidos sobre la viabilidad de promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.

La actividad de los péptidos se evaluó mediante la inhibición de la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de los parásitos en ensayo a corto plazo y proliferación.

Material y métodos

Las células vivas y metabólicamente activas reducen el MTT por las reductasas mitocondriales a formazán compuesto de color azul oscuro e insoluble. La pérdida de viabilidad celular supone la inhibición de dicha reducción. Los parásitos, preparados según las condiciones estándar en alícuotas de 120 μ L, se incubaron con la correspondiente concentración de péptido, 4 h a 25°C ó 32°C para promastigotes y amastigotes respectivamente. A continuación de cada alícuota se retiró un volumen de 100 μ L que fue transferido a un tubo eppendorf al cual adicionó 1mL de Hanks + Glc a 4°C para detener la incubación. Los parásitos fueron centrifugados (13000 x g, 4 min, 4°C en una microfuga), resuspendidos en una solución de 0.5 mg/mL MTT en Hanks + Glc y transferidos a una placa de microcultivo de 96 pocillos. Las células fueron incubadas durante 2 h en oscuridad a la temperatura de crecimiento respectiva para la forma del parásito ensayada. El formazán resultante de la reducción de MTT por los parásitos fue solubilizado mediante la adición de 100 μ L de 10% (p/v) SDS e incubación a 25°C en oscuridad (4h). Finalmente, se valoró absorbancia a 595 nm en un lector de placas ELISA (Diaz-Achirica *et al.*, 1998). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en condiciones de esterilidad, necesarios para la realización de los ensayos de proliferación (apartado 3.4.3). El parámetro de actividad utilizado fue la EC₅₀, (concentración efectiva 50) definida en el apartado 3.7.

3.4.3. Ensayo de inhibición de proliferación (72h) de promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi* por los péptidos.

El ensayo de proliferación de promastigotes se realizó transfiriendo alícuotas de 10 μ L, tomadas de la suspensión de 120 μ L descrita en el apartado 3.4.2, a una placa de 96 pocillos, con 200 μ L de medio RPMI sin rojo fenol más 10% de SFBI / pocillo. La proliferación de los parásitos supervivientes se realizó durante 72h a 25°C. A continuación se añadió a cada uno de los pocillos 50 μ L de MTT 2.5 mg / mL en Hanks + Glc y su reducción ensayada conforme al apartado 3.4.2.

En el ensayo de proliferación de amastigotes, las alícuotas de 10 μ L fueron transferidas a una placa de 96 pocillos que contenía 200 μ L / pocillo de medio de crecimiento de amastigotes (apartado 3.2.3) e incubadas durante 72 h a 32°C. Tras la incubación, el contenido de cada pocillo fue transferido a un tubo eppendorf, al cual se adicionó 1 mL de Hanks + Glc. Los tubos se centrifugaron en microcentrífuga (13000 x g, 4 min, 4°C) y se repitió el proceso 2 veces para eliminar la hemina del medio de cultivo. Finalmente, los amastigotes se resuspendieron en 100 μ L de 0.5 mg/mL MTT en Hanks + Glc, que fueron transferidos a una placa de 96 pocillos. La solubilización del formazán resultante y posterior valoración se realizó según el apartado 3.4.2. El

Material y métodos

parámetro de comparación de actividad de los péptidos fue LC_{50} (concentración letal 50) definida en el apartado 3.7.

3.5. ACTIVIDAD BACTERICIDA DE PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS.

3.5.1. Recolección de bacterias.

Las bacterias fueron recogidas en fase de crecimiento exponencial (5×10^{14} UFCs/mL) por centrifugación ($7000 \times g$, 3 min, $4^{\circ}C$), lavadas 2 veces con Hanks + Glc y resuspendidas en dicho medio a una densidad de 1×10^8 UFC/mL) para realizar los ensayos de permeabilización y alteración del potencial de membrana interna. Para los ensayos de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), las bacterias fueron cultivadas en medio MH hasta alcanzar fase de crecimiento exponencial; el cultivo se ajusta a 5×10^5 UFC/mL en el mismo medio y alícuotas de 90 μ L de esta suspensión fueron utilizadas en el ensayo.

3.5.2. Determinación de las CMIs.

La actividad de los compuestos sobre las bacterias se evaluó siguiendo el método de microdilución en placa con modificaciones (NCCLS, 2000; Saugar *et al.*, 2006). Las alícuotas de 90 μ L descritas en el apartado 3.5.1 fueron transferidas por triplicado a placas de cultivo de 96 pocillos, se añadieron 10 μ L del compuesto a las concentraciones deseadas. Las bacterias se incubaron durante toda la noche a $37^{\circ}C$, y posteriormente el crecimiento bacteriano fue evaluado por turbidez a 595 nm en un lector de placas. La CMI (Concentración mínima Inhibitoria) definida en el apartado 3.7 fue el parámetro de actividad utilizado.

3.6. CITOTOXICIDAD DE PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS.

Los ensayos de citotoxicidad de péptidos en células de mamífero se realizaron mediante evaluación de su actividad hemolítica sobre eritrocitos de carnero. Los eritrocitos de 1 mL de sangre desfibrinada de carnero fueron sometidos a centrifugación ($1000 \times g$, 10 min, $4^{\circ}C$) y posteriormente lavados con Hanks + Glc. Los eritrocitos fueron resuspendidos en dicho medio a una densidad de 2×10^7 células/mL, Alícuotas de 100 μ L de esta suspensión fueron transferidas a tubos eppendorf e incubadas con los péptidos a las concentraciones deseadas ($37^{\circ}C$, 4 h). Posteriormente los eritrocitos fueron centrifugados ($13.000 \times g$, 5 min) y alícuotas del

Material y métodos

sobrenadante (80 µL) fueron transferidas a una placa de 96 pocillos para medir la hemoglobina liberada a 550 nm en un lector de placas. El 100% de hemólisis se considera el obtenido por lisis de eritrocitos con 0.1% TX-100. Se definió como parámetro de actividad HC₅₀ (concentración hemolítica 50), apartado 3.7. (Solanas *et al.*, 2009).

3.7. PARÁMETROS DE ACTIVIDAD E ÍNDICE TERAPÉUTICO (IT) DE PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS.

Los parámetros de actividad escogidos fueron;

- EC₅₀ y LC₅₀ en ensayos en *Leishmania*, definidas como la concentración de péptido que inhibe la reducción de MTT en un 50%, tras 4h de incubación (EC₅₀) o tras ensayo de proliferación (LC₅₀), respecto al control sin tratamiento.

- CMI y CMI₅₀ en ensayos en bacterias, la cual se definió como la concentración mínima de péptido que inhibe totalmente o en un 50% el crecimiento bacteriano respecto al control sin tratar.

- HC₅₀ concentración de péptido que provoca la lisis del 50% de los eritrocitos respecto del control (0.1% TX-100) en ensayos de citotoxicidad.

Todos los parámetros, desviaciones estándar e intervalos de confianza del 95% se calcularon con la aplicación estadística del programa SigmaPlot, versión 11.0.

Por último, el IT de los péptidos se expresa numéricamente como una relación entre las concentraciones de péptido que provocan un efecto citotóxico del 50% (HC₅₀) y la que inhibe un 50% de la viabilidad celular [IT= HC₅₀ / (LC₅₀ o MIC₅₀)]. LC₅₀ y MIC₅₀ para *Leishmania* y bacterias respectivamente.

3.8. ACTIVIDAD DE PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LA MEMBRANA DEL PATÓGENO.

3.8.1. Despolarización de membrana.

La variación del potencial de membrana plasmática en *Leishmania* por efecto de los péptidos fue evaluada mediante cambios en la fluorescencia de sondas dependientes de potencial.

En *Leishmania* el ensayo se realiza en condiciones estándar, excepto por la adición de bisoxonol en el medio (concentración final 0.1 µM) y utilizar una placa negra de 96 pocillos. La variación de la fluorescencia (λ_{EX} = 540nm, λ_{EM} = 580nm) se midió en un lector de fluorescencia en placas *Polarstar Galaxy*. Una vez estabilizada la señal de

Material y métodos

fluorescencia, se añadieron los péptidos a las concentraciones respectivas y se registró el incremento de fluorescencia hasta alcanzar un valor constante. Para despolarización total se utilizó 5 μM CA(1-8)M(1-18). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y a 25°C o 32°C para promastigotes o amastigotes respectivamente. (Díaz-Achirica *et al.*, 1994; Guerrero *et al.*, 2004).

Para la medida del potencial de membrana en bacterias se emplea la sonda aniónica Disc₃(5) (λ_{EX} = 622nm, λ_{EM} = 670nm) a una concentración final de 0.6 μM . 100 μL de bacterias (1×10^8 UFC/mL) junto con la sonda, se transfieren a una placa negra de 96 pocillos. El incremento de la fluorescencia se midió a 37°C en un lector de fluorescencia en placas *Varioskan Flash*. Como control de despolarización total se utilizó 15 μM de gramicidina D en *S. aureus* y 0.1% TX-100 + 4 μM CA(1-8)M(1-18) con *A. baumannii*. (Saugar *et al.*, 2002).

3.8.2. Permeabilización de la membrana citoplásmica de *Leishmania* y bacterias.

La sonda vital fluorescente SYTOX Green, Pm~600, fue la empleada para estudiar la permeabilización de la membrana citoplásmica. El acceso de dicha sonda al citoplasma no ocurre en células viables, pero sí en aquellas con una desestructuración grave y con lesión de tamaño suficiente para permitir la entrada de la sonda al espacio intracelular implica un incremento de su fluorescencia por unión a los ácidos nucleicos.

Alícuotas de 100 μL de la suspensión celular (apartado 3.4.1 para *Leishmania* o 3.5.1. para bacterias) en 1 μM SYTOX Green en Hanks + Glc, fueron transferidas a una placa de 96 pocillos negra, y su fluorescencia medida en un espectrofluorímetro *Polarstar Galaxy* (λ_{EX} = 504nm, λ_{EM} = 523nm). Una vez que la fluorescencia basal (en ausencia de péptido) se estabilizó, los péptidos fueron añadidos y el incremento de fluorescencia registrado hasta que alcanza un valor estable final. La permeabilización total (100%) de *Leishmania* se considera la obtenida con 0.1% Triton X-100, en *Acinetobacter baumannii* la conseguida por la adición de 4 μM del péptido CA(1-8)M(1-18) más 0.1% Triton X-100, y en *S. aureus* la obtenida con lisostafina (0.07 μg / μL concentración final) (Nekhotiaeva N y Langel U, 2003). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y a la temperatura de incubación estándar respectiva para cada organismo (Díaz-Achirica *et al.*, 1998; Saugar *et al.*, 2002).

De forma complementaria y destinada a evaluar el grado de heterogeneidad de permeabilización dentro de la población de *Leishmania*, se utilizó un ensayo citofluorimétrico, para este fin una alícuota de 300 μL de parásitos (2×10^7 células / mL) fue incubada 4 h en condiciones estándar (apartado 3.4.1.) con una concentración de péptido que causó el 70-80% de inhibición de viabilidad. A continuación se añadió

Material y métodos

la sonda a una concentración final de 1 μM y la incorporación de la misma se analizó en un citómetro Coulter XL EPICS. El control de 100% de permeabilización se obtuvo con una concentración final de digitonina 5 μM . (Guerrero *et al.*, 2004).

3.8.3. Variación *in vivo* de los niveles de ATP intracelular en promastigotes de *L. donovani*.

El seguimiento *in vivo* y a tiempo real de la disminución de los niveles intracelulares de ATP libre fue realizado con promastigotes de la cepa 3-Luc de *L. donovani*, transfectados con una forma citoplasmática de la luciferasa de *Photinus pyralis*. Este ensayo se basa en la reacción catalizada por la luciferasa de conversión de D-luciferina a D-oxoluciferina en presencia de O_2 , con consumo de una molécula de ATP y emisión de un fotón. Para solventar la baja permeabilidad de la membrana a D-luciferina a pH fisiológico se emplea el análogo DMNPE-D-luciferina, que permea libremente a través de la membrana y es hidrolizado por esterasas intracelulares con liberación de D-luciferina (Luque-Ortega *et al.*, 2001).

La suspensión de promastigotes de la cepa 3-Luc en condiciones estándar, excepto por la adición de 25 μM DMNPE-D-luciferina, fue alicuotada (100 μL /pocillo) en una placa negra de 96 pocillos. La variación de luminiscencia fue seguida en un lector de placas *Polarstar Galaxy* con la configuración de luminiscencia, una vez que la señal alcanza un máximo estabilizado, se añadió el péptido a su concentración correspondiente, y se prosiguió el registro de luminiscencia. El ensayo se realizó por triplicado y como control durante todo el experimento se mantuvo una muestra sin tratar. El 100% de luminiscencia se estableció como el valor de luminiscencia anterior a la adición del péptido.

3.8.4. Alteraciones morfológicas. Microscopía electrónica.

Alicuotas de 800 μL de parásitos (2×10^7 células/mL) y de 8 mL de bacterias (6×10^8 células/mL) fueron incubadas en Hanks + Glc (4 h, 25 °C, 32 °C y 37 °C para promastigotes, amastigotes y bacterias respectivamente) junto con los péptidos a las concentraciones deseadas. Tras la incubación, las células fueron lavadas dos veces con tampón fosfato salino (PBS, 10 mM Na_2HPO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,2). A continuación fueron fijadas con 3% de glutaraldehído (90 min), lavadas con PBS dos veces e incubadas con 2.5% OsO_4 (90 min). Tras dos lavados con PBS las células fueron deshidratadas mediante incubaciones sucesivas en concentración de etanol creciente; 30% y 50% (30 min), 70% (12 h), 90% y 100% (30 min).

Material y métodos

Posteriormente se resuspendieron en óxido de propileno (Oxp) e incubaron durante 1 h, tras la cual se procedió a la sustitución del Oxp por una mezcla de resinas 3A / 7B [resina A: 38% Epon 812 + 62% DDSA (anhídrido dodecenil succínico); resina B: 52.6% Epon 812 + 47.4% MNA (anhídrido metil náutico)], para ello se realizaron incubaciones sucesivas en una mezcla de Oxp / resinas a diferentes proporciones volumétricas; 3 : 1 (30 min), 1 : 1 (30 min), 1 : 3 (12 h) y por último una incubación con la mezcla de resinas en ausencia de Oxp (30 min). La inclusión de las células en las resinas se completó con la polimerización de las mismas, catalizada por adición a la mezcla de 1.8% DMP 30 (2,4,6-tri(dimetilamino metil)fenol) como acelerador. Las muestras fueron distribuidas en cápsulas de gelatina de 5.5 mm de diámetro, polimerizadas (70°C, 48 h), talladas y cortadas con un ultramicrotomo LKB. Los cortes fueron montados sobre rejillas de cobre de trama G-200 cubiertas con formvar y teñidas con citrato de plomo (25 mM) para *Leishmania* y con acetato de uranilo (2%) para bacterias. Las muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-1230.

3.9. EFICIENCIA BIOLÓGICA (FITNESS) DE *A. baumannii* CEPAS SENSIBLE Y RESISTENTE A COLISTINA Y CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO RESISTENTE.

3.9.1. Competencia entre las cepas.

La cepa ATCC 19606, sensible a colistina, y su homóloga ATCC 19606R^C fueron mezcladas en idéntica proporción (10^7 UFC/mL) y cultivadas en medio líquido MHII desprovisto de colistina (37°C, 24 h y en agitación). A partir de este cultivo mixto se determinó el número de UFCs sensibles y de UFCs resistentes a PXE, mediante diluciones seriadas y cultivo en medio sólido (MH-agar) sin y con 32 μ M de colistina, tras 24 h de incubación a 37°C. Del cultivo inicial se realizó una dilución 1 / 1000 (medio MH), se incubó en las mismas condiciones y se repitió el proceso descrito de diluciones seriadas, cultivo en medio sólido y determinación de UFCs. Este mismo proceso fue repetido cada 24 h los 8 días que duró el experimento.

3.9.2. Pérdida espontánea de resistencia en ausencia de PXE.

La evaluación de la pérdida espontánea de resistencia a colistina se realizó mediante un ensayo similar al descrito (3.9.1), con la única diferencia de realizarse únicamente con la cepa resistente (medio MH sin PXE) y el cultivo en medio sólido se realizó en placas que contenían 9 y 32 μ M colistina. (Alonso *et al.*, 2004).

Material y métodos

3.9.3. Infección de macrófagos Raw 264.7 con las cepas de *A. baumannii* sensible y resistente a PXE.

Las células de la línea macrofágica murina fueron colectadas, lavadas con Hanks + Glc por centrifugación (500 x g, 10 min, 4°C) y resuspendidas en su medio de cultivo (apartado 3.2.4) (2.5×10^5 células/mL). Esta suspensión fue distribuida en alícuotas de 1 mL / pocillo en placas de 24 pocillos e incubadas a 37°C durante toda la noche. A continuación se retiró el medio junto con las células no adheridas a la placa, y se adicionó inmediatamente a cada pocillo 1 mL de suspensión de bacterias (5×10^6 bacterias/mL) en RPMI + 10% SFBIC en ausencia de antibióticos. La interacción bacteria-macrófago se desarrolló durante 2 h a 37°C. La capacidad de infección de ambas cepas se determinó mediante lisis de los macrófagos adheridos a la placa con 30 μ M de digitonina (concentración final), el producto de la lisis fue sembrado en placas de LB-agar. Tras 24 h de incubación a 37°C se contó el número de UFCs.

3.9.4. Viabilidad de las cepas de *A. baumannii* en presencia de TX-100, cloramfenicol y puromicina.

La susceptibilidad de las cepas sensible y resistente a PXE a cloramfenicol y puromicina fue evaluada mediante microdilución en placa (apartado 3.5.2). La susceptibilidad al detergente TX-100 se realizó de manera similar, excepto por la incubación de las bacterias con el detergente, limitada a 1 h. Tras la misma, las bacterias fueron centrifugadas y lavadas con medio MH líquido + 10% BSA (seroalbúmina bovina), para eliminar todo el TX-100 presente, resuspendidas en medio MH líquido fresco, transferidas a una placa de 96 pocillos e incubadas durante toda la noche a 37°C. El crecimiento se midió por turbidimetría a 595 nm en lector de placas.

3.9.5. *Dictyostelium discoideum* como modelo de virulencia.

D. discoideum se utilizó como modelo de virulencia de *A. baumannii*. Las células de *Dictyostelium* fueron cultivadas conforme al apartado 3.2.5. La inhibición de crecimiento de *D. discoideum* por *Acinetobacter* se evaluó por el tamaño del halo de inhibición de crecimiento bacteriano.

El ensayo estándar se realizó en una placa de SM-agar por distribución uniforme de 300 μ L de una mezcla (7.5×10^{12} células/mL) de *K. aerogenes* y *A. baumannii* en

Material y métodos

relación celular 1:1. La mezcla de bacterias es necesaria por el crecimiento anómalo observado en un cultivo homogéneo de *A. baumannii*. Simultáneamente se depositaron sobre la placa 4 inóculos de 20 μL de *D. discoideum* con diferente número de células (5×10^5 , 2.5×10^5 , 1.2×10^5 y 6×10^4 , número final de células). Las placas se incubaron durante 5 días a 25°C y se midió el diámetro del halo de inhibición bacteriano, observándose la aparición de colonias de *D. discoideum* en el interior del mismo. El control, 100% de crecimiento de *Dictyostelium*, se realizó mediante cultivo sobre un césped bacteriano homogéneo de *K. aerogenes* (7.5×10^{12} células/mL). Adicionalmente se realizaron dos controles para; i) La posible toxicidad de factores secretados por *A. baumannii* al medio, fue evaluada conforme al ensayo estándar, manteniendo el número de bacterias en el inóculo, pero formado exclusivamente por *K. aerogenes*, resuspendidas en medio constituido por medio fresco más sobrenadante de un cultivo de *Acinetobacter* en relación 1:1. ii) El ensayo estándar con sustitución de *A. baumannii* viable por células muertas, mediante cinco ciclos de congelación y descongelación. (Alibaud *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2004). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

3.9.6. Crecimiento de *A. baumannii* con diferentes fuentes de carbono como sustrato.

El crecimiento de *A. baumannii* sobre una única fuente de carbono como sustrato fue evaluado por cultivo en placas de 96 pocillos GN2, éstas contienen en cada uno de sus pocillos un sustrato diferente más tetrazolium, como indicador de crecimiento, que es reducido a formazán por las bacterias. Éstas fueron colectadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial, lavadas dos veces con Hanks + Glc y resuspendidas en medio de inoculación GN2 a una $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0.1$. Alícuotas de 150 μL de esta suspensión fueron añadidos a cada pocillo. Tras 24h de incubación a 37°C se midió crecimiento bacteriano a 595nm en un lector de placas multipocillo. (Alonso *et al.*, 2004).

3.9.7. Formación de *biofilm* bacteriano.

La formación del *biofilm* bacteriano de las dos cepas *A. baumannii* se determinó conforme a O'Toole (O'Toole *et al.*, 1999). Bacterias colectadas en fase estacionaria (cultivo a 16 h) se diluyeron en medio MH a $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0.05$ ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL). Alícuotas de 100 μL de esta suspensión fueron transferidas a placas de cultivo de 96 pocillos e incubadas a 37°C durante toda la noche. A continuación se retiró el medio,

Material y métodos

se realizaron dos lavados con agua y se añadió una solución de violeta cristal 0.1% (p/v) (120 µL/pocillo), que se incubó 10 min a 22°C, eliminándose el exceso de colorante no unido al *biofilm* por lavados con abundante agua. Tras evaporación total del solvente, se adicionó a cada pocillo 120 µL de etanol 100%. El sobrenadante resultante fue transferido a una nueva placa de 96 pocillos y la formación de *biofilm* se evaluó por absorbancia a 595nm en un lector de placas multipocillo.

3.9.8. Antibiógramas. Método de difusión en disco.

La susceptibilidad o resistencia de las cepas de *A. baumannii* ATCC19606 y ATCC19606R^C a diferentes antibióticos fue realizada mediante difusión en disco conforme a las instrucciones de CLSI (CLSI, 2005.). Los ensayos se realizaron en césped bacteriano crecido sobre placas de agar-MH. Los discos de antibióticos fueron colocados sobre dicho césped con pinzas estériles e incubadas a 37°C durante 24 h. Finalizada la incubación se midió el diámetro del halo de inhibición de crecimiento para cada antibiótico. Los antibióticos empleados en el ensayo fueron; ampicilina (Amp, 10µg), penicilina G (P, 10µg), imipenem (Imp, 10µg), gentamicina (CN, 10µg), ciprofloxacina (Cip, 5µg), amikacina (AK, 30µg) y rifampicina (RD, 5µg).

3.9.10. Susceptibilidad de las cepas al sistema del complemento.

La susceptibilidad al sistema del complemento humano de las cepas sensible y resistente a colistina de *A. baumannii* se llevó a cabo en condiciones estándar en placa de 96 pocillos, con la diferencia de crecer las bacterias en medio MH tras incubación de 1 h en presencia de 10% y 20% de suero humano, también se incluyó un control de suero inactivado por calor en las mismas proporciones. El 100% de viabilidad se siguió como cultivo de las bacterias en medio MH y ausencia de suero. Tras incubación a 37°C durante la noche, el crecimiento bacteriano se evaluó por absorbancia a 595nm en un lector de placas multipocillo. El ensayo se realizó por triplicado. El suero se obtuvo a partir de sangre de donantes sanos voluntarios, la inactivación del sistema del complemento se realizó mediante incubación a 56°C durante 1 h.

Material y métodos

3.9.11. Afinidad de dansil-polimixina B (DPXB) por *A. baumannii*.

La dansil-polimixina (DPX) se prepara según el método de Schindler y Teuber (Schindler y Teuber, 1975); 20 mg de polimixina B (sulfato) fueron disueltos en 0.6 ml de NaHCO_3 0.1 M, y 5 mg de cloruro de dansilo en 0.4 mL de acetona, ambas disoluciones fueron mezcladas e incubadas a temperatura ambiente en oscuridad durante 90 min. A continuación la mezcla fue cargada en una columna de Sephadex G-10 (50 cm, 1 cm) y se recogieron fracciones de 1-2 mL. La dansil-polimixina eluye por delante del cloruro de dansilo no unido, con fluorescencia bajo la luz ultravioleta amarillenta, mientras que la del cloruro de dansilo no unido es verde-azulada.

La unión de DPXB fue evaluada por incremento de fluorescencia ($\lambda_{\text{EX}} = 340$, $\lambda_{\text{EM}} = 460$) de una suspensión de 300 μL de bacterias en PBS (2×10^6 UFC/mL) en un espectrofluorímetro Hitachi F2000. A continuación otros 300 μL de células fueron concentradas por centrifugación en microcentrífuga, resuspendidas en 50 μL de PBS, incubadas durante 30 min en oscuridad a 37°C con la máxima concentración de DPXB (20 mg/mL) y finalmente observadas en un microscopio de fluorescencia Leika.

3.10. PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE *Acinetobacter baumannii*.

3.10.1. Extracción de proteínas citoplasmáticas.

La extracción de proteínas citoplasmáticas se realizó a partir de 25 mL de las células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento de la cepa sensible ($\text{D.O}_{600\text{nm}} = 1.5$, $\sim 2 \times 10^{15}$ UFCs) y 35 mL de un cultivo en fase exponencial de la cepa resistente ($\text{D.O}_{600\text{nm}} = 1.0$, $\sim 2 \times 10^{15}$ UFCs). Tras lavado exhaustivo de las células con 20 mL de PBS (2 veces) y un lavado adicional con 10 mL de agua doblemente destilada, mediante centrifugación (20 min, 4°C, 4500 x g en centrífuga Sorvall en rotor de ángulo fijo SS-34), el sedimento fue rápidamente congelado y mantenido una noche a -80°C. Todo el proceso siguiente se realizó a 4°C. Las células fueron descongeladas lentamente y resuspendidas en 300 μL de tampón de lisis (10 mM SDS, 190 mM DTT, 80 mM Tris, 4 mM MgCl_2 , 17 $\mu\text{g/mL}$ de ARNasa y 7 $\mu\text{g/mL}$ de ADNasaI). Esta suspensión fue transferida a tubos *lysing matrix B* y las células fueron lisadas en un *Hybaid Ribolyser* (4°C, 45s, velocidad 6). La matriz inorgánica fue retirada por centrifugación (13,000xg, 20 min, 4°C) y el sobrenadante transferido a tubos eppendorf de 1.5 mL y tratados con el *kit Ready-prep 2D cleanup* de Bio-Rad, conforme las instrucciones del fabricante. Finalmente el precipitado fue resuspendido en tampón de rehidratación (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 0.5% tampón IPG pH 4.0-7.0, 16.2

Material y métodos

mM DTT, 0.002% azul de bromofenol) y la concentración de proteínas totales se determinó por el método del ácido bicinonínico usando un *kit* comercial (BCA Protein Assay Reagent, Pierce) y según las instrucciones del fabricante. (Fernandez-Reyes *et al.*, 2009).

3.10.2. Extracción de proteínas de membrana.

Las células de partida fueron obtenidas conforme al apartado anterior, excepto por proceder de cultivos de mayor volumen (200 y 250 mL de las cepas sensible y resistente respectivamente). Tras la descongelación, el sedimento fue resuspendido en 5 mL del tampón de lisis (tampón fosfato 0.1 M pH = 6.0, ADNasa I 0.1 mg/mL, ARNasa 0.1 mg/mL, 10 mM MgSO₄). Las muestras fueron disgregadas, mediante dos ciclos consecutivos, por una prensa de *French* a 1200 PSIs. Finalmente, al lisado resultante se le añadió sal potásica de EDTA a una concentración final de 15 mM. Las bacterias no lisadas fueron retiradas mediante centrifugación (4500 x g, 20 min, 4°C) y el sobrenadante fue sometido a ultracentrifugación (140,000 x g, 50 min, 4°C) para la obtención de la fracción de membranas. La posible contaminación con material soluble se eliminó mediante dos ciclos de lavado y resuspensión del sedimento en 10 mL del tampón de lisis. A continuación, el sedimento se resuspendió en 20 mL 0.1 M de Na₂CO₃ y sometido a agitación continua durante 1 h a 4°C. Finalmente, la fracción de membranas se recuperó por ultracentrifugación en las mismas condiciones y el sedimento resultante se resuspendió en 2 mL de Tris-HCl 50 mM, pH = 7.3 con 1% de ASB-14, detergente zwitteriónico (3-[N,N-dimetil(3-miristoaminopropil) amonio]propanosulfonato más 2 mM de tributilfosfina (TBP). La concentración de proteínas se midió por el método del ácido bicinonínico, para ajustar a las condiciones del *kit Ready prep 2D cleanup*, que fue utilizado a continuación siguiendo las recomendaciones del fabricante. (Fernandez-Reyes *et al.*, 2009).

3.10.3. Electroforesis en gel bidimensional.

75 µg de proteínas de las muestras de la fracción citoplásmica (apartado 3.10.1.) fueron solubilizadas en 300 µL de tampón de rehidratación y añadidas a tiras de de isoelectroenfoque de 17 cm, pH 4.0-7.0. La rehidratación se realizó a 50 V, 12 h a 20°C. A continuación la separación por electroenfoque se realizó en 3 etapas: 1.- 300V, 45 min, 2.- Gradiente creciente de 300 a 3500 V, 22 h 45 min, 3.- Enfoque final 5000 V 30 min. El límite máximo de intensidad fue 99 mA por tira. Para la segunda dimensión, las tiras de isoelectroenfoque resultantes se equilibraron en 2 mL de

Material y métodos

tampón de equilibrado (0.12M Tris-acetato, pH =7.0, 0.6 M urea, 30% glicerol, 5% SDS). Los geles fueron polimerizados siguiendo las indicaciones de la casa comercial (12% acrilamida, 0.2% biscalamida) en el equipo *Protean II xi cell* (BioRad), una vez polimerizados los geles, las tiras se depositaron sobre los mismos y se realizó una electroforesis convencional SDS-PAGE a una intensidad constante de 70 mA/gel en tampón de electroforesis (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1% SDS). Las muestras de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana se procesaron siguiendo el mismo protocolo descrito, excepto la carga que se aumentó a 150 µg de proteínas por gel, para detectar proteínas minoritarias, y el gradiente de pH de las tiras de isoelectroenfoque (pH 3.0-10.0).

3.10.4. Tinción de proteínas con plata en geles bidimensionales.

El método de tinción de proteínas con plata se eligió por su compatibilidad con análisis posterior por espectrometría de masas (Kim H *et al.*, 2007). Las etapas fueron los siguientes: 1.- Fijación (1h, 40% ácido acético, 10% etanol). 2.- Sensibilización (30 min, 30% etanol, 0.2% Na₂S₂O₃, 6.8% CH₃COONa). 3.- Tres ciclos sucesivos de lavado en agua milli-Q (5 min). 4.- Tinción (0.25% AgNO₃, 20min). 5.- Dos ciclos de lavado (1min) en agua milli-Q. 6.- Revelado (2-5min, 0.25% Na₂CO₃, 0.04% CH₂OH). 7.- Finalización de la reacción (10min, 1.46% EDTA-Na₂). 8.- Lavado (3 ciclos, 5min, agua milli-Q). La obtención de imágenes se realizó en un densitómetro GS-800 (BioRad).

3.10.5. Análisis 2D-DIGE.

El análisis 2D-DIGE fue realizado conforme la figura M.1. El análisis de imágenes se realizó con el programa *DeCyder 5.01* (GE Healthcare). El análisis diferencial de los geles se realizó por comparación entre cada uno de los puntos de las cepas resistente (R) y sensible (S), el estándar (ST) se utilizó como control interno de cada gel y el cociente Cy3/Cy2, Cy5/Cy2 para normalizar la emisión de fluorescencia de cada punto. El cálculo de las medias se realizó entre las 4 réplicas y las diferencias de expresión entre cada una de las proteínas de las muestras R y S fueron determinadas aplicando el test de *t* de *Student*. Se comparó la media y desviación estándar de la cantidad de proteína en cada punto entre los grupos S y R para encontrar diferencias significativas no debidas a variación experimental.

Material y métodos

3.10.6. Digestión en gel y extracción de péptidos.

El proceso de digestión, extracción e identificación de proteínas fue realizado por el grupo de Prof. D Andreu en la *Universitat Pompeu Fabra*. Una vez teñidos con plata los geles 2D y visualizadas las manchas se realizó el corte manualmente de las proteínas de interés, y posterior digestión en placas de 96 pocillos en un *Multiscreen vacuum manifold*. Previo al análisis espectral, se realizó la muestra reducción, alquilación y digestión con tripsina, de proteínas para su identificación.

3.10.7. Identificación de proteínas.

La identificación de proteínas se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOFF en un instrumento *Voyager DE-STR*, y mediante nano LC-MS/MS en un instrumento Q-Star Pulsar acoplado a una fuente nano ESI (ionización de electrospray), se realizó tanto por inyección directa como por separación previa por nanocromatografía líquida (Ultimate II system, LCPackings). Para la identificación de proteínas se usó el motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience) sobre una base de datos de secuencias de proteínas de *A. baumannii* (15949 secuencias disponibles en la base de datos no redundante NCBI). En la búsqueda se indicaron los siguientes parámetros: tripsina como endoproteasa utilizada para la digestión, carbamidometilación de residuos de cisteína y oxidación de proteínas, como modificaciones fijas y variables respectivamente. La identificación de homología de secuencia se realizó con BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Para la interpretación de las diferencias en el metabolismo se utilizó el programa KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>) (Fernandez-Reyes *et al.*, 2009).

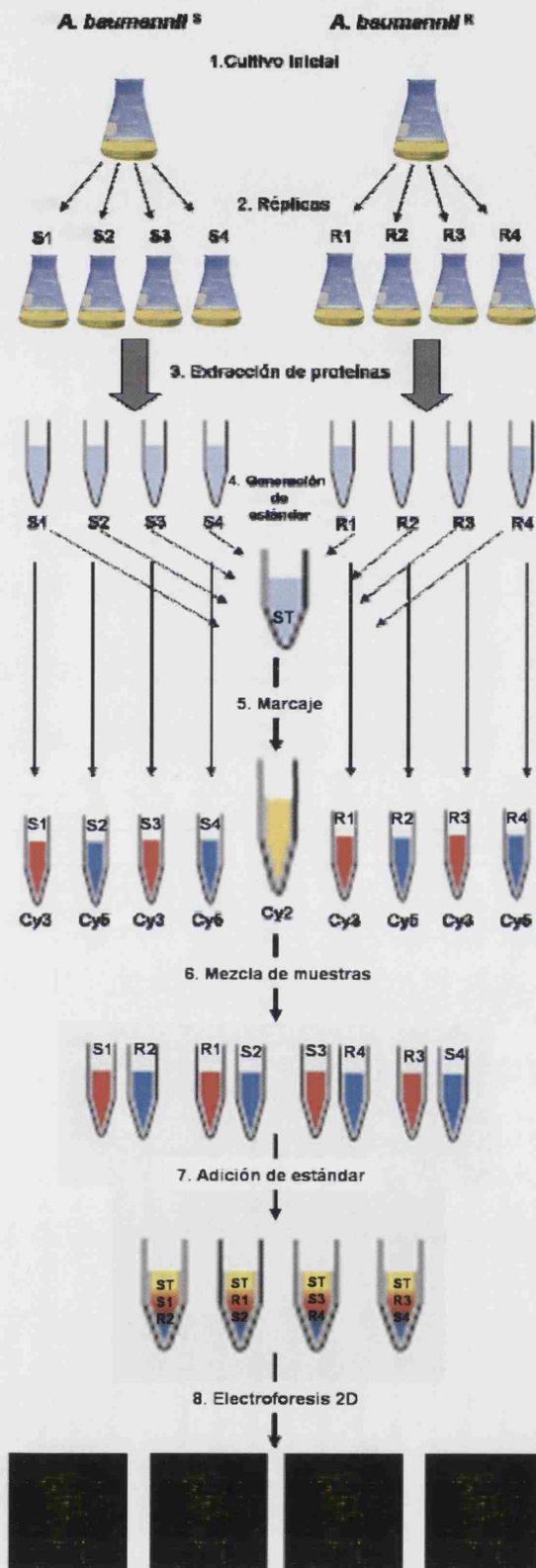


Figura M 1. 1. Cultivo inicial de las cepas sensible y resistente a colistina.

2. Réplicas de las cepas sensible (S₁, S₂, S₃, S₄) y resistente (R₁, R₂, R₃, R₄)

3. Extracción de proteínas de membrana (apartados 3.10.1 y 3.10.2) de la fracción citosólica y de membrana.

4. Generación de control interno, estándar (ST), mezclando cantidades equivalentes de proteína de las cuatro réplicas de las cepas sensible (6.25 µg de cada una de las réplicas S₁, S₂, S₃, S₄) y resistente (6.25 µg de cada una de las réplicas R₁, R₂, R₃, R₄).

5. Marcaje de proteínas según el protocolo recomendado por GE Healthcare, las sondas fluorescentes Cy2, Cy3 y Cy5 fueron disueltas en dimetilformamida (Sigma) a una concentración final de 1 nmol / µL, las proteínas fueron marcadas con las sondas Cy2, Cy3 y Cy5, manteniendo una relación de 50 µg de proteína por 400 pmol de sonda (30min a 4°C en oscuridad) la reacción se detuvo con la adición de 10 µL de lisina (Sigma) a una concentración 10 mM (10 min, 4°C en oscuridad). El estándar fue marcado con la sonda Cy2 en idénticas condiciones a las descritas.

6 y 7. Mezcla de muestras, según el diseño experimental se mezclaron 50 µg de cada uno de los extractos marcados; 50 µg de la cepa sensible, 50 µg de la cepa resistente y 50 µg del estándar (150 µg de proteína total).

8. Electroforesis bidimensional de los 4 geles en idénticas condiciones a las descritas en el apartado 3.10.2. La visualización de las proteínas y digitalización de las imágenes se realizó con un escaner de fluorescencia Typhoon 9400 (GE Healthcare) Cy2 ($\lambda_{EX}=492$ $\lambda_{EM}=510$), Cy3 ($\lambda_{EX}=550$ $\lambda_{EM}=570$), Cy5 ($\lambda_{EX}=650$ $\lambda_{EM}=670$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLOGOS DE CA(1-7)M(2-9) CON ϵ -N,N,N-TRIMETIL LISINAS.

4.1.1. INTRODUCCIÓN

La modificación de residuos específicos de péptidos antibióticos (véase tabla I.4.) es una de las estrategias más utilizadas para la optimización de su actividad antimicrobiana (Zeletzsky y Tossi, 2006), entre las que se incluye la conjugación del grupo ϵ -NH₂ de las Lys con una amplia variedad de reactivos. En los últimos años la epigenética ha resaltado la importancia de las sustituciones en el grupo ϵ -NH₂ de Lys en el control de diversos procesos biológicos, por ejemplo procesos críticos del ADN como replicación, reparación y transcripción, son regulados por modificaciones postraduccionales tales como metilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación, de los residuos de Lys en histonas. Más específicamente, el grado de metilación de histonas es uno de los mecanismos de regulación de activación o represión de genes, a través de modificación de la arquitectura del nucleosoma (Smith y Denu, 2009). Adicionalmente, la metilación de residuos de Lys de factores de transcripción regula su actividad (Subramanian *et al.*, 2008). Fuera de un contexto epigenético, otro proceso biológico controlado por metilación de lisinas es la trimetilación de la calmodulina, con una activación de la NAD kinasa tres veces superior a la obtenida con calmodulinas no metiladas (Roberts *et al.*, 1986).

El boom de la metilación de Lys en procesos epigenéticos contrasta llamativamente con la escasez de tal modificación en el campo de los péptidos antimicrobianos. Entre los escasos ejemplos descritos se encuentran: 1) Descripción de la metilación de al menos un residuo de Lys en la oncoricina III, péptido aislado de la secreción cutánea de la trucha arco iris con actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Fernandes *et al.*, 2003). 2) Un análogo sintético monometilado del péptido KSL, utilizado en formulaciones de goma de mascar con efecto anticaries (Na *et al.*, 2007). 3) La lactoferricina, donde la trimetilación de cualquiera de sus tres residuos de Lys provoca disminución de su actividad antimicrobiana (Haug *et al.*, 2007). 4) En la melitina, la trimetilación de todos los grupos ϵ -amino de las Lys y del grupo amino de la Gly N-terminal causó pérdida completa de su actividad hemolítica (Ramalingam y Bello, 1992). 5) Finalmente, otro ejemplo relacionado es la trimetilación δ -amino de los dos residuos de ornitina de la gramicidina S, que preserva la actividad del péptido parental frente a *S. aureus* y

Resultados y discusión

Bacillus subtilis (Kawai *et al.*, 1991).

En este trabajo hemos estudiado los efectos de la trimetilación de ϵ -NH₂ de residuos de Lys del péptido híbrido cecropina A-melitina CA(1-7)M(2-9) (KWKLFFKKIGAVLKVL-NH₂) sobre su actividad microbica y citotóxica. Un total de 10 análogos fueron sintetizados (5 monosustituidos, 4 disustituidos y un análogo con todas las Lys sustituidas). Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados sobre eritrocitos de carnero, y su actividad microbica se evaluó en el parásito *Leishmania*, como modelo eucariota, y en las bacterias *A. baumannii* y *S. aureus* como modelos procariotas de bacterias Gram-negativa y Gram-positiva respectivamente. Adicionalmente se realizó un estudio de los efectos de la trimetilación sobre la conformación del péptido en solución mediante 2D-RMN. La trimetilación de Lys de CA(1-7)M(2-9) no causa variación de la carga neta del péptido, sin embargo, sí va a impedir la formación de puentes de hidrógeno de los grupos aminos e incrementa, al menos localmente, el volumen de la cadena lateral e hidrofobicidad del péptido. El objetivo es conocer en detalle la potencialidad de dicha estrategia en la optimización de PAEs, tomando CA(1-7)M(2-9) como prototipo. La elección del mismo fue debida a: i) la experiencia existente en el grupo sobre péptidos híbridos cecropina A-melitina, ii) su tamaño es muy adecuado para síntesis. iii) presenta un extremo amino terminal muy rico en lisinas, procedente de la cecropina, más un residuo de lisina en posición 13, de la parte central del segmento hidrofóbico de la melitina parental.

Resultados y discusión

4.1.2. RESULTADOS

4.1.2.1. CA(1-7)M(2-9) y análogos utilizados en el estudio.

Las secuencias y caracterización química del péptido parental CA(1-7)M(2-9) y de sus análogos sustituidos se representan en la tabla R.1. Los péptidos fueron sintetizados por el grupo del Prof. D. Andreu (Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona). Todos ellos se obtuvieron mediante síntesis en fase sólida según protocolos estándar de química Fmoc. Para la incorporación de Lys trimetiladas en las posiciones determinadas se empleó Fmoc-Lys(Me₃)-OH comercial. Tras desprotección total de los grupos y liberación del péptido de la columna, los péptidos fueron purificados por cromatografía de fase reversa HPLC, y caracterizados por espectrometría de masas MALDI-TOFF. Todos los péptidos presentaron una pureza superior al 95%. Los tiempos de retención (*t_R*) en la columna de los análogos sustituidos fueron en todos los casos ligeramente menores a los del péptido parental, sin diferencias significativas asociadas al número de Lys trimetiladas.

Tabla R.1. Secuencias y parámetro moleculares de CA(1-7)M(2-9) y análogos con ε-NH₂ trimetil lisinas.

Péptido	Secuencia ^a	<i>t_R</i> (min) ^b	Masa molecular	
			Esperada	Encontrada ^c
CA(1-7)M(2-9)	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.53	1769.18	1770.00
εM-K ¹	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.05	1812.24	1813.00
εM-K ³	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.11	1812.24	1813.00
εM-K ⁶	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.10	1812.24	1813.00
εM-K ⁷	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.24	1812.24	1813.00
εM-K ¹³	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.22	1812.24	1813.00
εM-K ^{1,3}	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.12	1855.29	1856.00
εM-K ^{3,6}	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.03	1855.29	1856.00
εM-K ^{6,7}	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.14	1855.29	1856.00
εM-K ^{1,13}	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.19	1855.29	1856.00
εM-K ^{1,3,6,7,13}	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	9.01	1984.45	1985.00

^a Todos los péptidos se encuentran amidados en su extremo C-terminal. Las lisinas trimetiladas aparecen en rojo (K). ^b *t_R*= Tiempo de retención en minutos. ^c Masa molecular calculada por espectrometría de masas MALDI-TOFF.

Resultados y discusión

4.1.2.2. Actividad en *Leishmania* y eritrocitos de carnero.

4.1.2.2.1. Evaluación de la viabilidad del parásito.

El efecto leishmanicida de los péptidos se evaluó mediante la inhibición de la capacidad de reducción de MTT de los parásitos (apartado 3.4.2). Todos los péptidos ensayados (excepto el análogo $\epsilon\text{M-K}^{1,3,6,7,13}$) inhibieron la viabilidad de los parásitos a concentraciones micromolares, tanto en ensayo a corto plazo (4 h) como en proliferación (72 h). Las figuras R.1 y R.2 muestran la inhibición de reducción de MTT de promastigotes y amastigotes a diferentes concentraciones del péptido de referencia CA(1-7)M(2-9) y de sus análogos monosustituídos (Fig. R.1) y disustituídos (Fig. R.2). La igualdad existente entre inhibición de viabilidad a corto plazo y proliferación, demuestra que el efecto final del péptido requiere una incubación igual o inferior a 4 h y que dicho efecto es irreversible. Los amastigotes son, en general, más resistentes a los péptidos que los promastigotes, ya observado en trabajos anteriores con otros análogos de cecropina A-melitina (Luque-Ortega *et al.*, 2003).

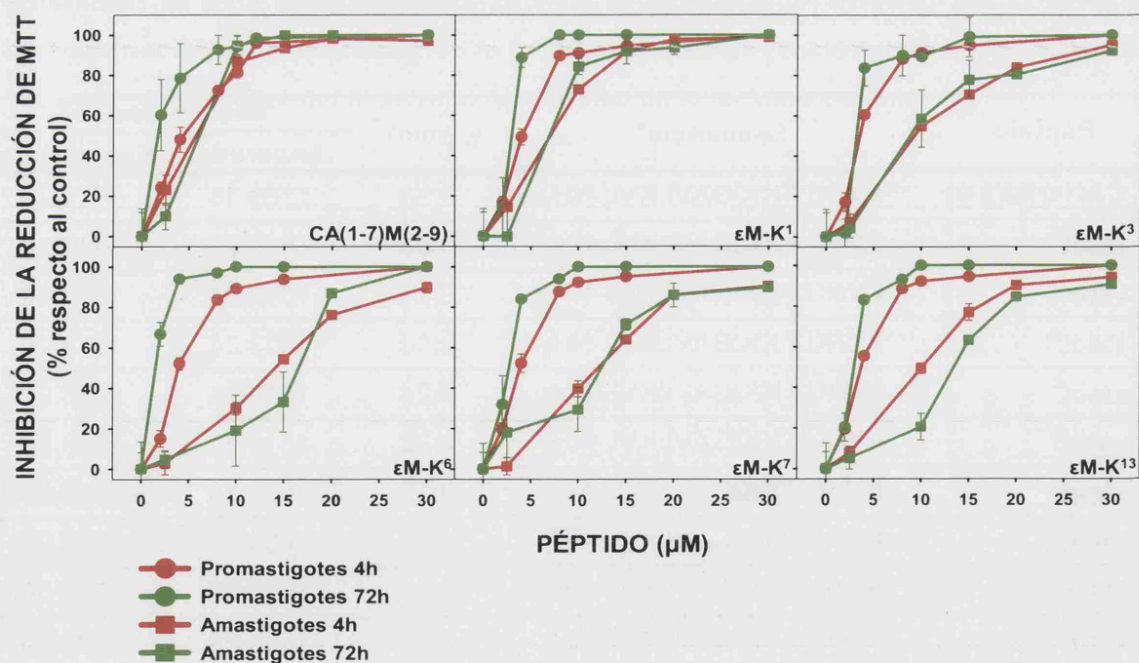


Figura R.1. Actividad de CA(1-7)M(2-9) y de sus análogos monosustituídos sobre la reducción de MTT de promastigotes de *L. donovani* y de amastigotes de *L. pifanoi*. Curvas de Inhibición a 4h y 72h.

Resultados y discusión

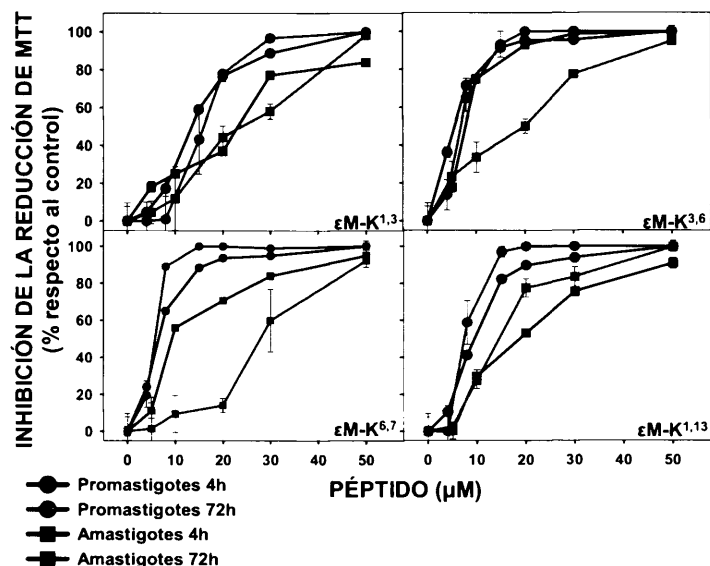


Figura R.2. Actividad de análogos disustituidos de CA(1-7)M(2-9) sobre la reducción de MTT de promastigotes de *L. donovani* y de amastigotes de *L. pifanoi*. Curvas de Inhibición a 4h y 72h.

La Tabla R.2 muestra los valores de EC₅₀ y LC₅₀ de los diferentes péptidos para promastigotes y amastigotes, calculados a partir de las curvas de inhibición de reducción de MTT.

Tabla R.2. Actividad leishmanicida de CA(1-7)M(2-9) y análogos con ε-NH₂. trimetil-Lys.

Péptido	* Promastigotes <i>L. donovani</i>		* Amastigotes <i>L. pifanoi</i>	
	EC ₅₀ (μM)	LC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	LC ₅₀ (μM)
CA(1-7)M(2-9)	1.8 (± 0.0)	1.5 (± 0.1)	4.3 (± 0.2)	4.5 (± 0.2)
εM-K ¹	3.9 (± 0.3)	2.8 (± 0.0)	6.0 (± 0.8)	6.4 (± 1.2)
εM-K ³	3.3 (± 0.0)	3.1 (± 0.6)	9.4 (± 0.8)	8.2 (± 1.0)
εM-K ⁶	3.7 (± 0.0)	1.7 (± 0.0)	13.4 (± 0.1)	16.3 (± 1.3)
εM-K ⁷	3.7 (± 0.2)	2.3 (± 0.0)	11.4 (± 0.8)	12.1 (± 1.2)
εM-K ¹³	3.5 (± 0.1)	2.5 (± 0.0)	10.1 (± 0.6)	11.6 (± 0.5)
εM-K ^{1,3}	12.8 (± 0.4)	15.5 (± 0.6)	16.2 (± 0.1)	24.8 (± 1.2)
εM-K ^{3,6}	5.1 (± 0.2)	6.7 (± 0.2)	7.4 (± 0.3)	16.5 (± 1.6)
εM-K ^{6,7}	6.1 (± 0.1)	5.3 (± 0.6)	9.2 (± 2.0)	27.0 (± 1.2)
εM-K ^{1,13}	8.8 (± 0.3)	7.6 (± 0.1)	17.0 (± 3.0)	13.5 (± 1.4)
εM-K ^{1,3,6,7,13}	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0

EC₅₀ y LC₅₀ *(± Desviación estándar).

Resultados y discusión

Una tendencia general es la pérdida de actividad gradual con el número de lisinas trimetiladas, siendo el más activo el parental sin trimetilar y el menos activo el completamente trimetilado; este último no presentó actividad a 50 μM . La influencia de la posición de la $\epsilon\text{-NH}_2$ trimetilación dentro de los análogos monosustituidos no fue significativa, sin embargo sí lo fue en los disustituidos, el análogo $\epsilon\text{-M-K}^{1,3}$ presentó una pérdida de actividad mayor que el resto de dicho grupo.

4.1.2.2.2. Citotoxicidad de los péptidos e Índice Terapéutico.

La potencial aplicación práctica de los PAEs requiere la evaluación de su toxicidad en células de mamífero. La hemólisis de eritrocitos de carnero es un método válido para aquellos péptidos que actúen mediante permeabilización de membrana, como son los péptidos cecropina A-melitina. Los péptidos se incubaron 4h con eritrocitos de carnero y la hemólisis se valoró por liberación de hemoglobina al medio (apartado 3.6). La figura R.3 representa la variación de la misma con la concentración de péptido.

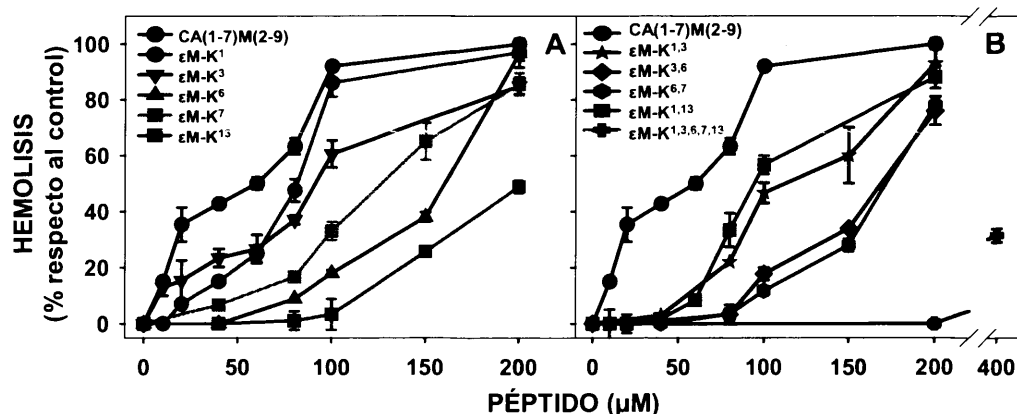


Figura R.3. Actividad de CA(1-7)M(2-9) y análogos monosustituidos (A), disustituidos y pentasustituido (B) sobre eritrocitos de carnero.

La inclusión de lisinas trimetiladas en CA(1-7)M(2-9) supone una disminución significativa de su actividad hemolítica, que nuevamente es proporcional al número de trimetilisinas incorporadas al péptido, el análogo pan-trimetilado carece de hemólisis a 200 μM y a la máxima concentración ensayada (400 μM) sólo causó un 32%.

A partir de las curvas anteriores se calculó el valor de HC_{50} de todos los compuestos (apartado 3.7). El Índice Terapéutico (IT) fue definido como el cociente $\text{HC}_{50} / \text{LC}_{50}$. La tabla R.3 resume las HC_{50} e IT de CA(1-7)M(2-9) y sus análogos para promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.

Resultados y discusión

Tabla R.3. Valores de HC₅₀ sobre eritrocitos de carnero e IT de CA(1-7)M(2-9) y análogos con ε-NH₂. trimetil-Lys.

Péptido	** Índice Terapéutico		* Eritrocitos
	Promastigotes	Amastigotes	HC ₅₀ (μM)
CA(1-7)M(2-9)	26.8 (1.0)	8.9 (1.0)	40.2 (± 2.2)
εM-K ¹	27.6 (1.0)	12.0 (1.3)	77.2 (± 9.1)
εM-K ³	27.6 (1.0)	10.4 (1.2)	85.6 (± 4.6)
εM-K ⁶	92.7 (3.4)	9.6 (1.1)	157.6 (± 7.3)
εM-K ⁷	71.3 (2.6)	13.5 (1.5)	164.0 (± 7.8)
εM-K ¹³	63.0 (2.3)	13.5 (1.5)	157.4 (± 1.0)
εM-K ^{1,3}	6.7 (0.2)	4.2 (0.5)	105.0 (± 3.5)
εM-K ^{3,6}	17.4 (0.6)	7.1 (0.8)	117.3 (± 9.9)
εM-K ^{6,7}	25.3 (0.9)	4.9 (0.5)	134.0 (± 8.8)
εM-K ^{1,13}	10.8 (0.4)	6.1 (0.7)	82.6 (± 9.4)
εM-K ^{1,3,6,7,13}	ND	ND	> 400.0

*(Desviación estándar). Índice Terapéutico (IT), IT = HC₅₀/LC₅₀. ** Entre paréntesis valor normalizado con respecto al péptido parental. ND: No determinado. Promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.

Conforme a la tabla R.3 el IT mejora en tres de los derivados monosustituídos (εM-K⁶, εM-K⁷, εM-K¹³) respecto a CA(1-7)M(2-9), principalmente debido a la reducción de la actividad hemolítica de dichos derivados.

4.1.2.2.3 Alteraciones en la membrana plasmática de promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.

Dado que los péptidos híbridos cecropina A-melitina actúan mediante un mecanismo letal basado en la permeabilización de la membrana plasmática del patógeno (Díaz-Achirica *et al.*, 1998), se procedió a estudiar si la trimetilación de lisinas del péptido CA(1-7)M(2-9) provocaba alguna modificación sobre dicho mecanismo de acción.

Resultados y discusión

- Entrada de la sonda fluorescente vital SYTOX Green.

SYTOX Green es una sonda catiónica ($P_m = 600$) incapaz de atravesar la membrana plasmática del parásito cuando ésta se encuentra intacta, pero sí, cuando existen lesiones en la misma de tamaño suficiente. La sonda en el interior celular y se une a los ácidos nucleicos incrementando su fluorescencia (apartado 3.8.2).

Todos los análogos de CA(1-7)M(2-9), a excepción de $\epsilon M-K^{1,3,6,7,13}$, causaron permeabilización de la membrana plasmática del promastigote y del amastigote. La figura R.4 representa el porcentaje de fluorescencia tras 30 min de incubación con los péptidos a 4 μM en ambas formas del parásito. Dicha concentración fue seleccionada por ser representativa conforme a los resultados de actividad obtenidos. La permeabilización lograda por un péptido determinado, es consistentemente superior en promastigotes que en amastigotes.

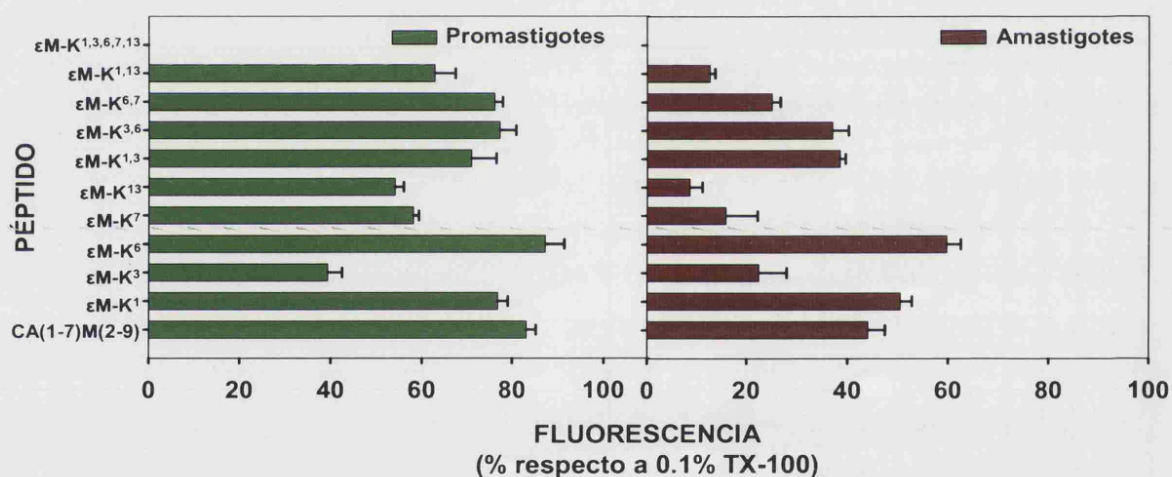


Figura R.4. Fluorescencia de SYTOX Green en promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi* tras incubación (30 min) con el péptido a una concentración final de 4 μM . Los valores se refieren al 100% de fluorescencia obtenido con 0.1% de Triton-X100.

A continuación, se estudió la dependencia de la permeabilización de membrana plasmática con la concentración de péptido, conforme al apartado 3.8.2. Los resultados obtenidos se representan en las figuras R.5 (promastigotes) y R.6 (amastigotes). En todos los casos estudiados se observó un incremento de fluorescencia dependiente de concentración y una rápida cinética de actuación de los péptidos.

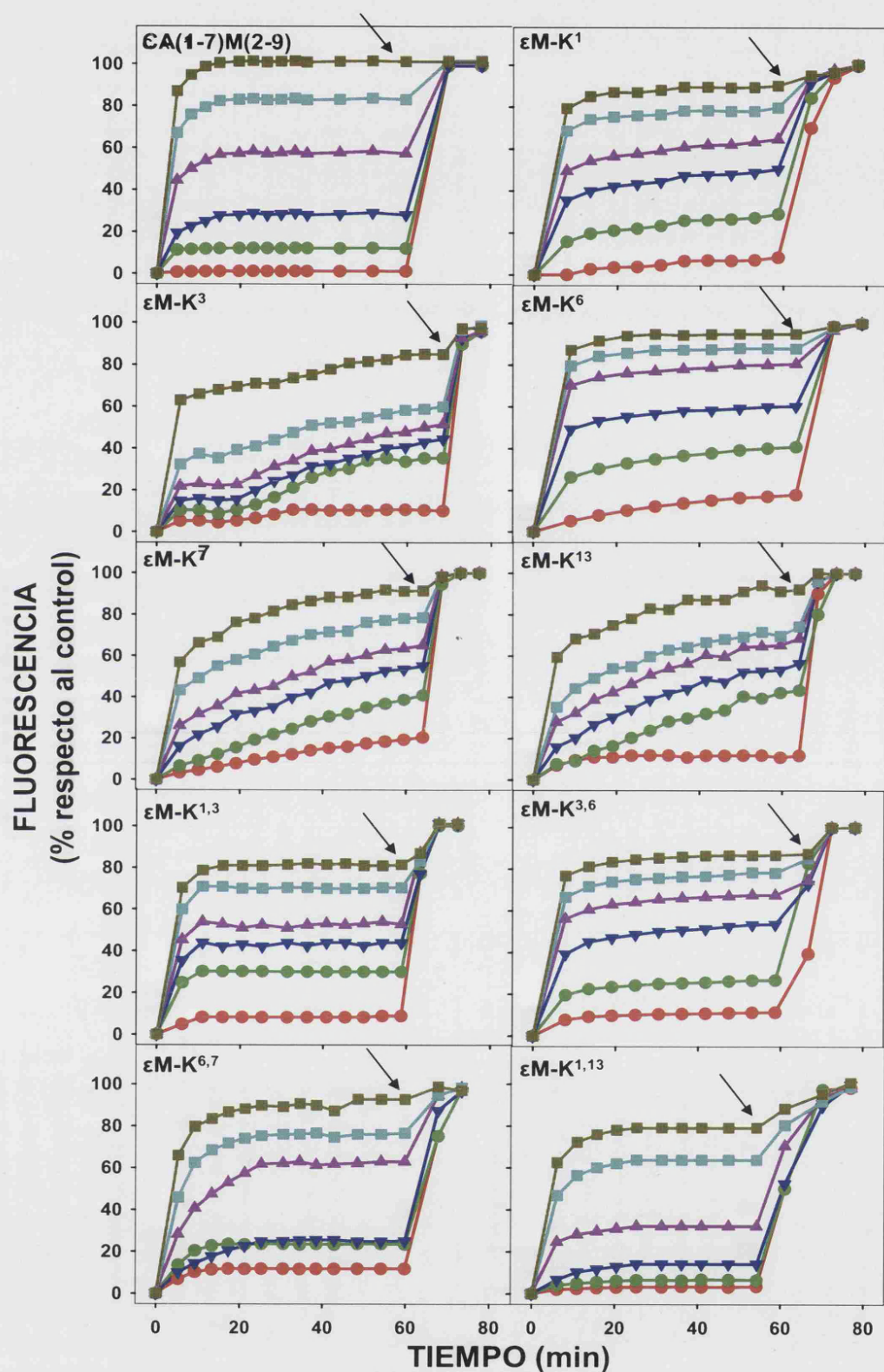


Figura R.5. Dependencia de la fluorescencia de SYTOX Green con la concentración de péptido en promastigotes de *L. donovani*. Las flechas indican la adición de 0.1% de TX-100. Concentración de péptido (μM). —●— 0.5 —●— 1.0 —▲— 1.5 —▲— 2.0 —■— 4.0 —■— 6.0

Resultados y discusión

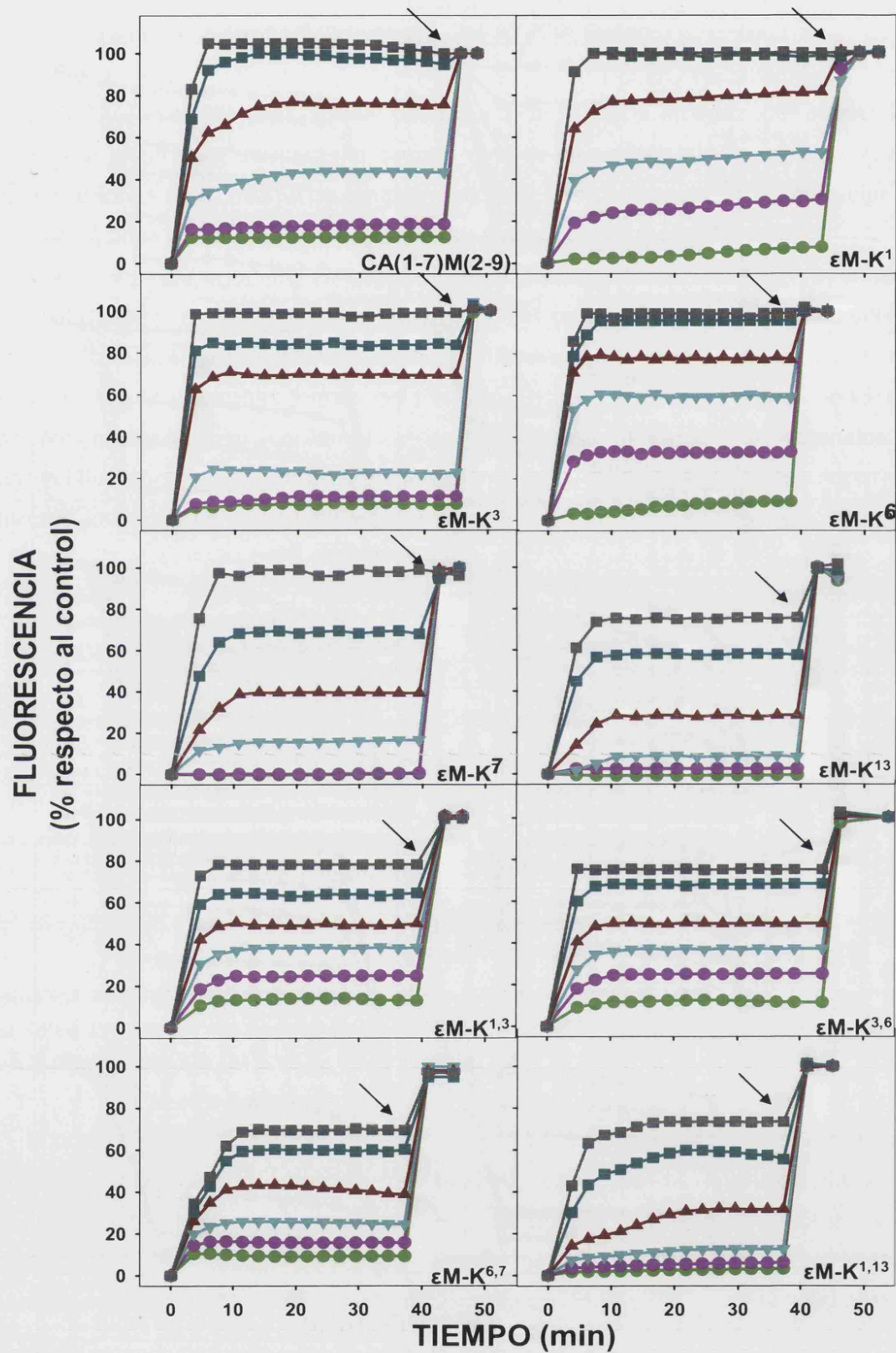


Figura R.6. Dependencia de la fluorescencia de SYTOX Green con la concentración de péptido en amastigotes de *L. pifanoi*. Las flechas indican la adición de 0.1% de TX-100. Concentración de péptido (μM) 1.0 2.0 4.0 8.0 16.0 20.0

• Variación del potencial de la membrana plasmática del parásito.

La variación del potencial de membrana plasmática fue estudiada mediante el incremento de fluorescencia de la sonda aniónica bisoxonol (apartado 3.8.1). Esta sonda incrementa su fluorescencia cuando se inserta en la matriz hidrofóbica de la bicapa lipídica de la membrana. En parásitos intactos, su potencial es negativo en la cara citoplásmica de la membrana, impidiendo la inserción en la misma. En una membrana despolarizada con disipación de los gradientes iónicos a través de ella, la sonda particiona por afinidad con la matriz hidrofóbica de la membrana, incrementando su fluorescencia.

La adición de CA (1-7)M(2-9) y de sus análogos trimetilados, a excepción del pan-trimetilado, provoca un incremento de la fluorescencia de la sonda. A efectos comparativos, la figura R.7 representa el valor de fluorescencia obtenido para cada análogo a 4 μ M tras 30 min de incubación de los parásitos con el péptido. El incremento de fluorescencia dependiente de la concentración se representa en las figuras R.8 y R.9 en promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi* respectivamente.

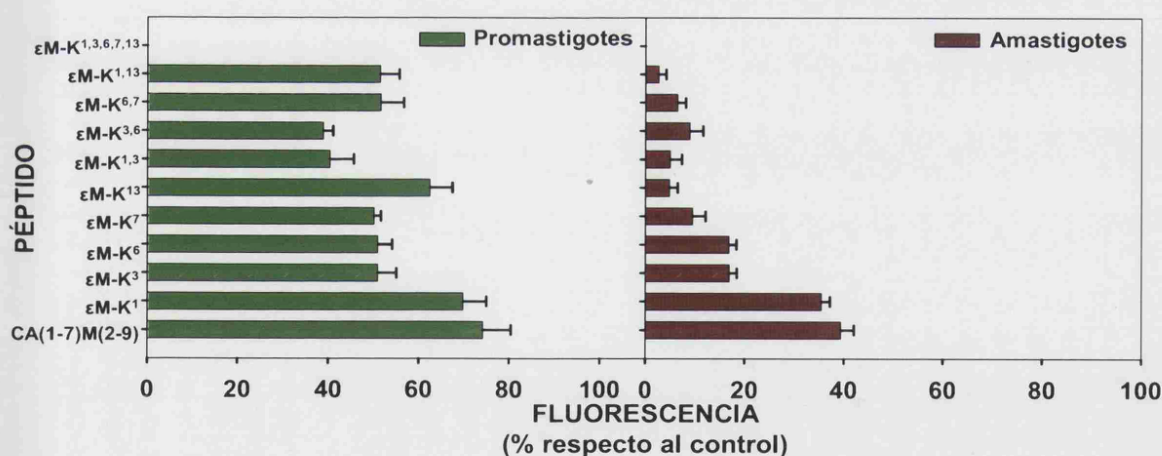


Figura R.7. Fluorescencia de la sonda bisoxonol en promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi* tras incubación (30 min) con el correspondiente péptido a una concentración final de 4 μ M. Los valores están normalizados respecto al 100% de fluorescencia causado por 5 μ M de CA(1-8)M(1-18).

Resultados y discusión

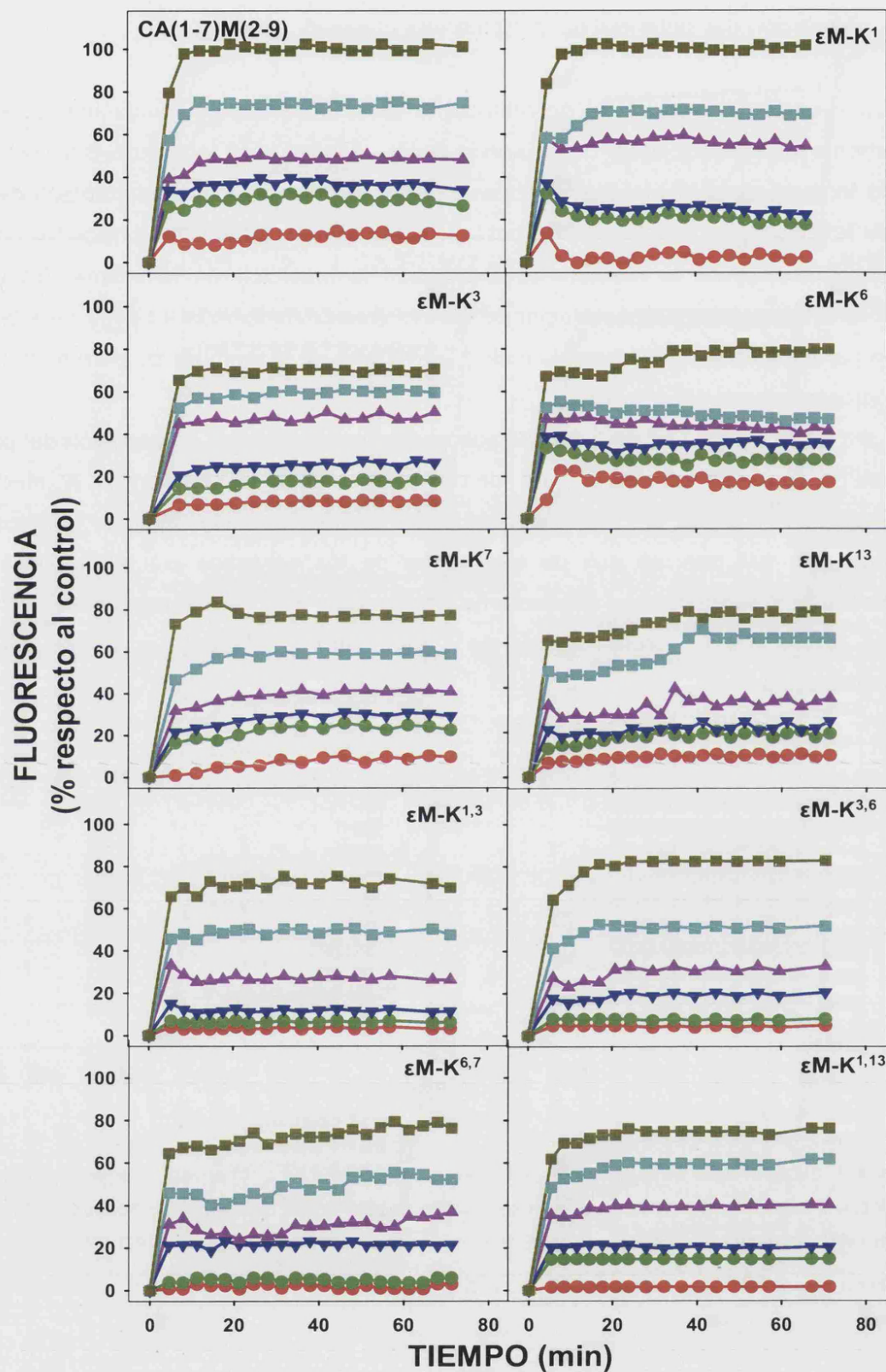


Figura R.8. Variación de la fluorescencia de la sonda bisoxonol con la concentración de péptidos en promastigotes de *L. donovani*. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 5 μM de CA(1-8)M(1-18). Concentración de péptido (μM.): 0.5 1.0 1.5 2.0 4.0 6.0

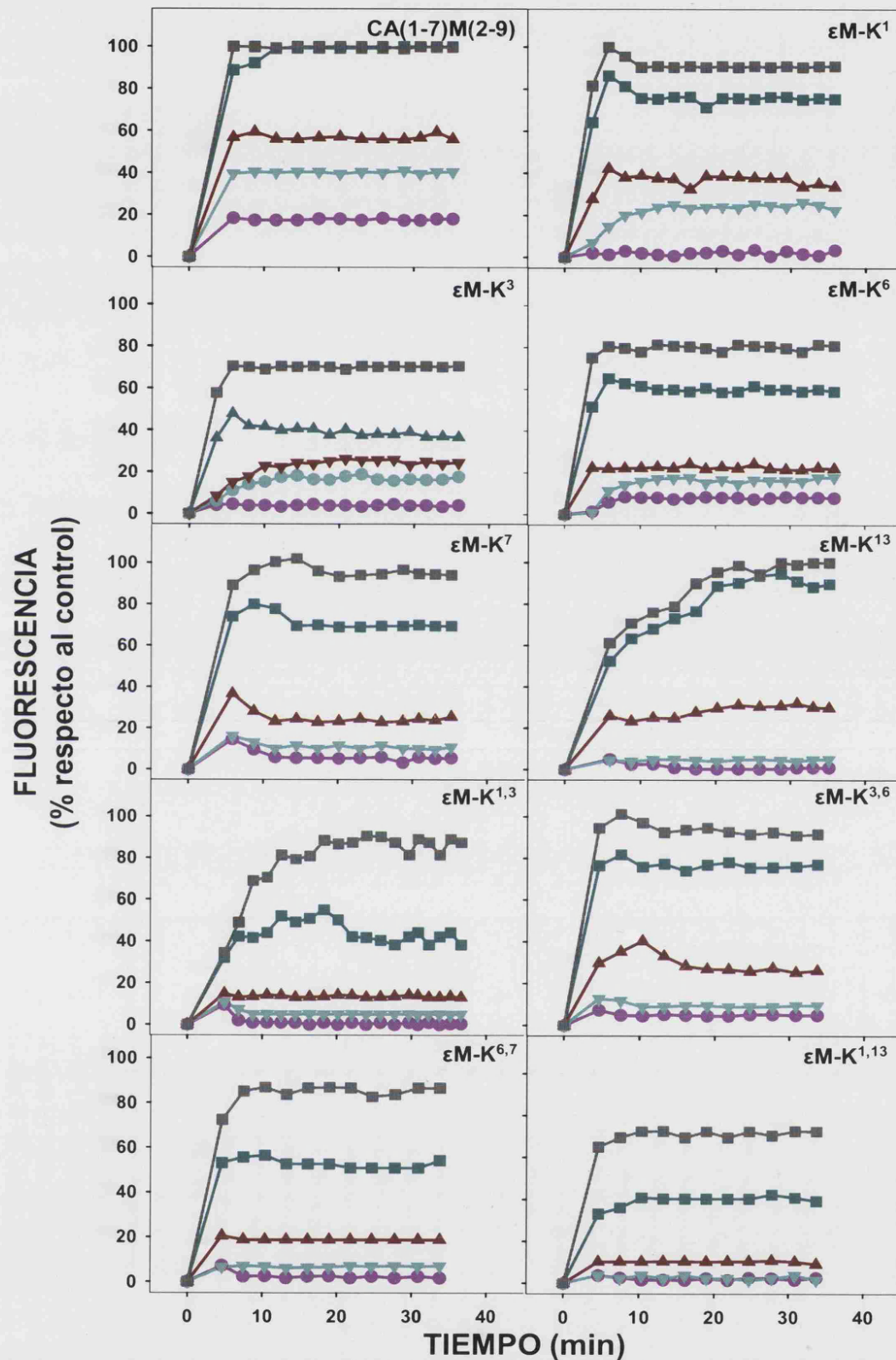


Figura R.9. Variación de la fluorescencia de la sonda bisoxonol con la concentración de péptidos en amastigotes *L. pifanoi*. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 5 μM de CA(1-8)M(1-18). Concentración de péptido. (μM). —●— 2.0 —▲— 4.0 —△— 8.0 —■— 16.0 —■— 20.0

Resultados y discusión

- Variación de los niveles de ATP intracelular.

La permeabilización de la membrana plasmática por los péptidos induce una disminución de luminiscencia en promastigotes de la cepa 3-Luc de *L. donovani*, según se explicó en el apartado 3.8.3 de material y métodos.

La figura R.10 muestra el porcentaje de luminiscencia, respecto al control, de promastigotes de *L. donovani* 3-Luc tras 30 min de incubación con el péptido a 4 μ M. Todos los péptidos producen una disminución de los niveles de ATP intracelulares, a excepción del análogo con todas las pan-trimetilado que no causó efecto alguno a dicha concentración.

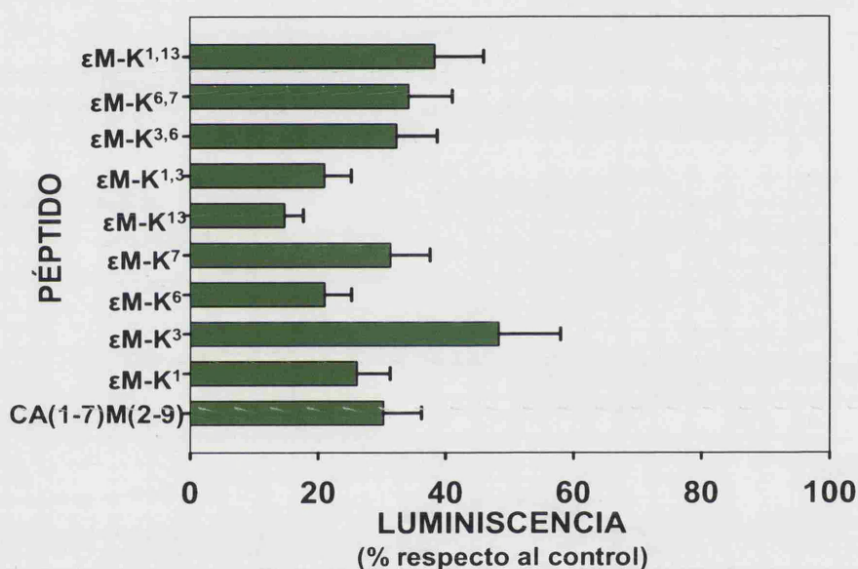


Figura R.10. Porcentaje de luminiscencia de promastigotes 3-Luc de *L. donovani* respecto al control, tras incubación (30 min) con el péptido respectivo a una concentración final de 4 μ M.

La figura R.11 representa la cinética de disminución de luminiscencia, asociada a la concentración de ATP intracelular en promastigotes de *L. donovani* 3-Luc tras la adición de diferentes concentraciones de péptido. La disminución de luminiscencia es dependiente de la concentración de péptido; el descenso de los niveles de luminiscencia, directamente relacionados a los de ATP, muestra idéntica tendencia al resto de parámetros de permeabilización de membrana estudiados.

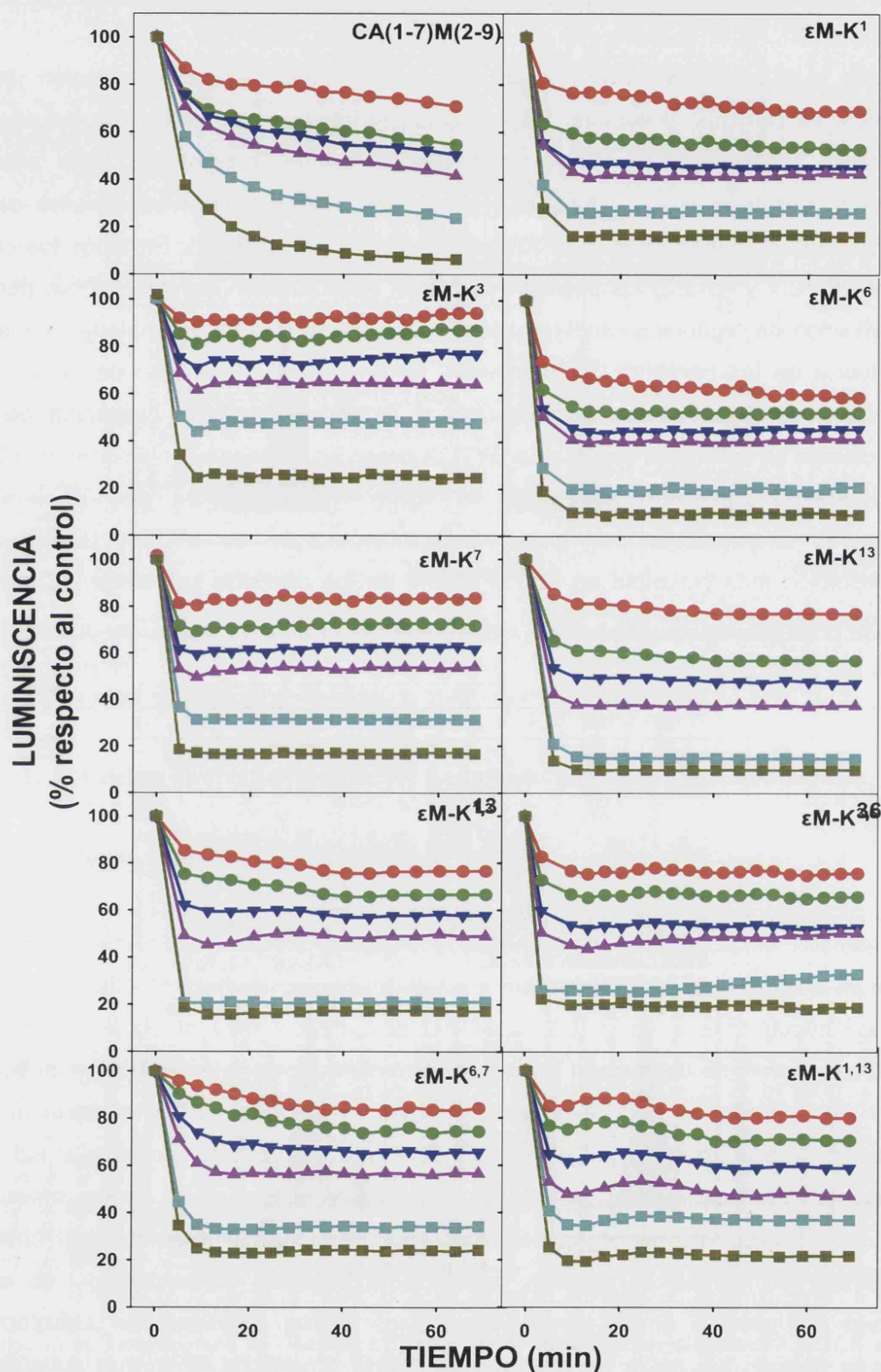


Figura R.11. Cinética de pérdida de luminiscencia en promastigotes de *L. donovani* cepa 3-Luc tras la adición de CA(1-7)M(2-9) y sus derivados con lisinas trimetiladas a diferentes concentraciones (μM). ● 0.5 ● 1.0 ▼ 1.5 ▲ 2.0 ■ 4.0 ■ 6.0

Resultados y discusión

- Alteraciones morfológicas y su relación con la permeabilidad de membrana.

Con el objetivo de completar los resultados obtenidos sobre la acción de los péptidos, se procedió a estudiar los cambios morfológicos causados por los mismos (apartado 3.8.4) mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello los parásitos fueron incubados durante 4 h con una concentración equipolente de los péptidos que causa entre el 70%-80% de inhibición de viabilidad. En todos los casos (figuras R.12.1 y R.12.2) los péptidos causaron vacuolización del citoplasma, pérdida de definición de orgánulos citoplasmáticos y una salida masiva del material celular de la mayoría de los parásitos. En contraste, un porcentaje minoritario de los mismos aparecen con daño mínimo o nulo. Con el fin de confirmar la existencia de dos poblaciones, se estudió la entrada de SYTOX green en idénticas condiciones mediante citofluorimetría (apartado 3.8.2). En la figura R.12 aparecen dos poblaciones claramente diferenciadas con alta y baja incorporación de SYTOX Green, cuya interpretación más plausible es que el efecto de los péptidos se realice de manera "todo o nada".

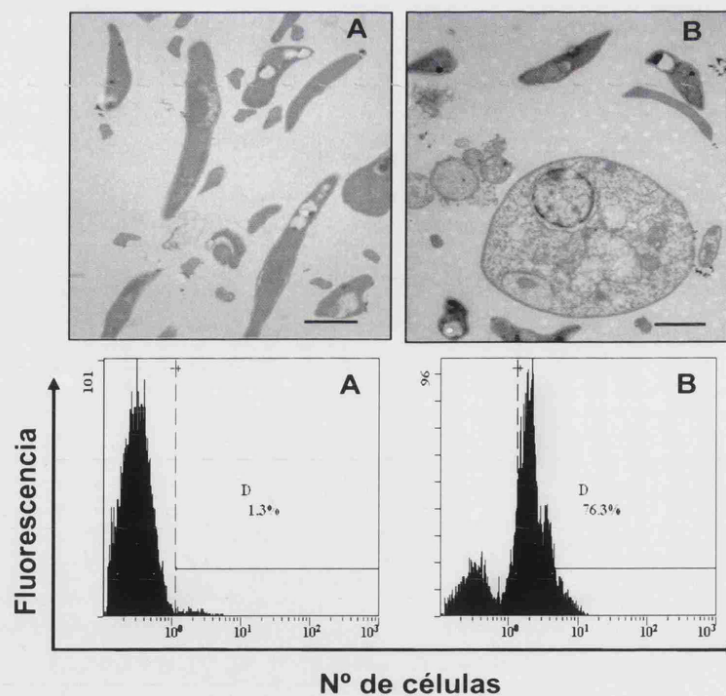


Figura R.12.1. Microscopía electrónica de transmisión (fila superior) de promastigotes de *L. donovani* tratados con 4 μM de CA(1-7)M(2-9), concentración que causa entre 70-80% de inhibición de viabilidad. Barra de aumento = 1 μm . El panel inferior muestra los niveles de incorporación de la sonda vital SYTOX Green en promastigotes de *L. donovani* incubados bajo idénticas condiciones a las de microscopía electrónica. A: Parásitos control, B: CA(1-7)M(2-9) (4 μM)

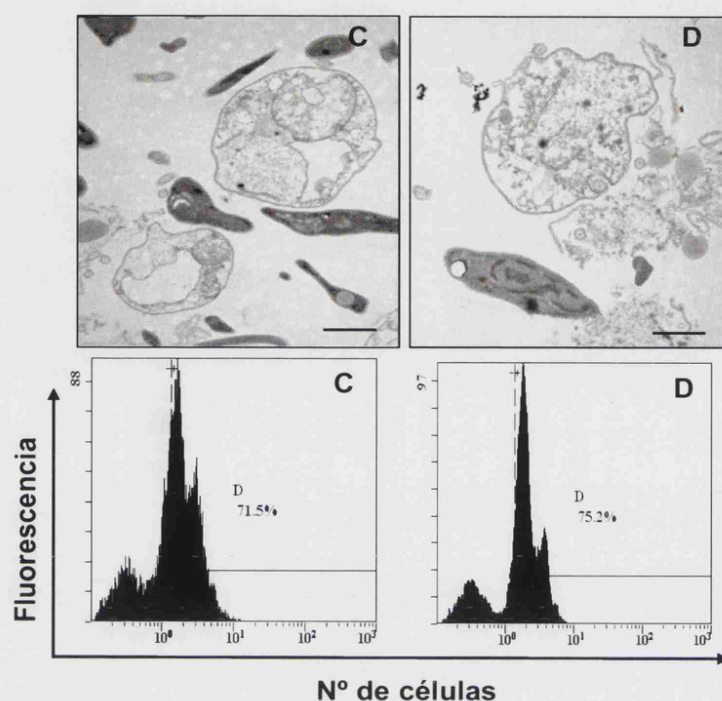


Figura R.12.2. Microscopía electrónica de transmisión (fila superior) de promastigotes de *L. donovani*. Barra de aumento = 1 μ m. Panel inferior muestra los niveles de incorporación de la sonda vital SYTOX Green. C: ϵ M-K⁶ (6 μ M), D: ϵ M-K^{1,13} (12 μ M).

4.1.2.3. Actividad sobre *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*.

4.1.2.3.1. Evaluación de la actividad bactericida.

La actividad bactericida de los péptidos se determinó mediante microdilución líquida, descrito el apartado 3.5.2 de material y métodos. En la tabla R.4 se muestran los resultados de la CMI y CMI₅₀ de CA(1-7)M(2-9) y de sus análogos con Lys trimetiladas. Todos los análogos mostraron actividad bactericida en rango micromolar de concentraciones, a excepción del análogo pan-trimetilado. La cepa de *A. baumannii* sensible a colistina fue más sensible a la acción de los péptidos que su homóloga resistente, cuyas CMIs fueron ligeramente superiores. Los valores de CMI para la bacteria Gram-positiva fueron en todos los casos superiores a los obtenidos para la cepa de *A. baumannii* sensible a colistina. Aunque el patrón de actividades microbicidas no siguió un patrón consistente, como norma general los péptidos trimetilados raramente mostraron actividades superiores a las del péptido parental, siendo iguales o inferiores.

La mejora del IT es debida a que la trimetilación de lisinas supuso reducción de la toxicidad del péptido (véase apartado 4.1.2.2). El IT (tabla R.5) mejoró en la mayoría

Resultados y discusión

de los compuestos respecto al péptido de referencia CA(1-7)M(2-9), tanto en la bacteria Gram-positiva como en la Gram-negativa.

Tabla R.4. Valores de CMI y CMI₅₀ (μM) para bacterias.

Péptido	* <i>A. baumannii</i> S ^C		* <i>A. baumannii</i> R ^C		* <i>S. aureus</i>	
	CMI	CMI ₅₀	CMI	CMI ₅₀	CMI	CMI ₅₀
CA(1-7)M(2-9)	2.5 (± 0.5)	1.1 (± 0.3)	4.5 (± 0.5)	2.2 (± 0.3)	7.0 (± 1.0)	2.9 (± 0.1)
εM-K ¹	3.0 (± 0.0)	1.3 (± 0.1)	8.0 (± 1.0)	4.9 (± 1.1)	7.0 (± 1.0)	3.4 (± 0.5)
εM-K ³	3.0 (± 0.0)	1.7 (± 0.3)	7.0 (± 1.0)	3.9 (± 1.9)	7.0 (± 1.0)	2.4 (± 0.3)
εM-K ⁶	2.0 (± 0.5)	1.4 (± 0.1)	6.0 (± 1.0)	3.1 (± 1.1)	7.0 (± 1.0)	4.6 (± 0.4)
εM-K ⁷	3.0 (± 0.0)	1.9 (± 0.4)	7.5 (± 1.0)	3.5 (± 1.0)	10.0 (± 0.0)	7.2 (± 0.6)
εM-K ¹³	3.5 (± 0.5)	2.1 (± 0.1)	9.5 (± 0.5)	5.9 (± 1.1)	6.5 (± 0.5)	4.4 (± 0.2)
εM-K ^{1,3}	5.0 (± 0.5)	3.5 (± 0.5)	20.0 (± 0.0)	10.0 (± 0.0)	8.0 (± 2.0)	4.1 (± 1.2)
εM-K ^{3,6}	3.0 (± 0.0)	2.0 (± 0.1)	8.0 (± 1.0)	5.7 (± 1.2)	10.0 (± 0.0)	6.2 (± 0.5)
εM-K ^{6,7}	4.0 (± 0.0)	2.6 (± 0.1)	10.0 (± 0.0)	7.2 (± 0.7)	20.0 (± 0.0)	10.7 (± 2.9)
εM-K ^{1,13}	2.5 (± 0.5)	1.8 (± 0.5)	10.0 (± 0.0)	5.4 (± 1.2)	8.5 (± 0.5)	4.5 (± 0.3)
εM-K ^{1,3,6,7,13}	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0

* (± Desviación estándar). S^C: *A. baumannii* ATCC 19606 sensible a colistina, R^C: *A. baumannii* ATCC 19606 resistente a colistina.

Tabla R.5. Valor del Índice Terapéutico de CA(1-7)M(2-9) y análogos con Lys trimetiladas referidos a su actividad bactericida.

Péptido	* Índice Terapéutico		
	<i>A. baumannii</i> S ^C	<i>A. baumannii</i> R ^C	<i>S. aureus</i>
CA(1-7)M(2-9)	36.5 (1.0)	18.3 (1.0)	13.8 (1.0)
εM-K ¹	59.4 (1.7)	15.8 (0.9)	22.7 (1.6)
εM-K ³	50.3 (1.4)	22.0 (1.2)	35.7 (2.6)
εM-K ⁶	112.2 (3.0)	50.8 (2.8)	34.3 (2.3)
εM-K ⁷	86.3 (2.3)	46.8 (2.6)	22.8 (1.6)
εM-K ¹³	74.9 (2.0)	26.7 (1.5)	35.8 (2.6)
εM-K ^{1,3}	30.0 (0.8)	10.5 (0.6)	13.1 (0.9)
εM-K ^{3,6}	58.6 (1.6)	20.6 (1.1)	18.9 (1.4)
εM-K ^{6,7}	51.5 (1.4)	18.6 (1.0)	12.5 (0.9)
εM-K ^{1,13}	45.8 (1.2)	15.3 (0.8)	18.4 (1.3)
εM-K ^{1,3,6,7,13}	ND	ND	ND

Índice Terapéutico = HC₅₀/CMI₅₀* Entre paréntesis, valor normalizado respecto al péptido parental. ND: No determinado. S^C: *A. baumannii* ATCC 19606 sensible a colistina, R^C: *A. baumannii* ATCC 19606 resistente a colistina.

4.1.2.3.2. Permeabilización de la membrana interna de las cepas de *A. baumannii* sensible y resistente a colistina.

El mecanismo de acción de los péptidos en bacterias Gram-negativas se determinó mediante el estudio de la permeabilización y variación del potencial de membrana interna de ambas cepas.

- Entrada de la sonda fluorescente vital SYTOX Green al citoplasma bacteriano.

Los resultados obtenidos en bacterias fueron similares a los obtenidos en el modelo eucariota. Excepto ϵ M-K^{1,3,6,7,13}, todos los péptidos permeabilizaron la membrana interna de bacterias de manera dependiente de su concentración en un rango micromolar. Las figuras R.14 y R.15 muestran la variación de fluorescencia tras la adición de péptido a diferentes concentraciones en las cepas de *A. baumannii* sensible y resistente a colistina, respectivamente. En la figura R.13 se muestra la fluorescencia obtenida tras 30 min de incubación con los diferentes péptidos a una concentración de 1.5 μ M sobre ambas cepas de *A. baumannii*.

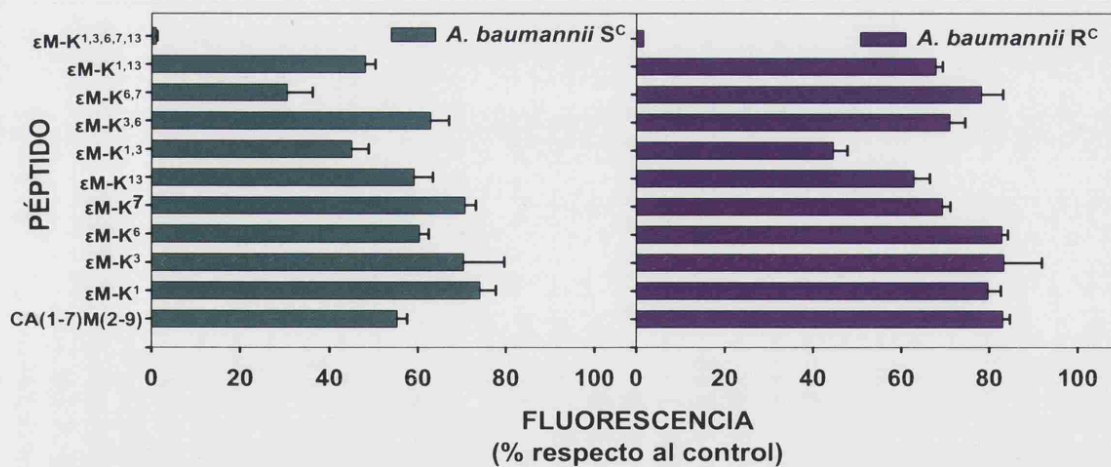


Figura R.13 Porcentaje de fluorescencia de la sonda SYTOX Green tras incubación (30 min) de *A. baumannii* cepas ATCC 19606 S^C y R^C con el péptido a una concentración final de 1.5 μ M. Los resultados se expresan como % de fluorescencia obtenida con 0.1% de Triton-X100 + 4 μ M CA(1-8)M(1-18), considerada como permeabilización total.

Resultados y discusión

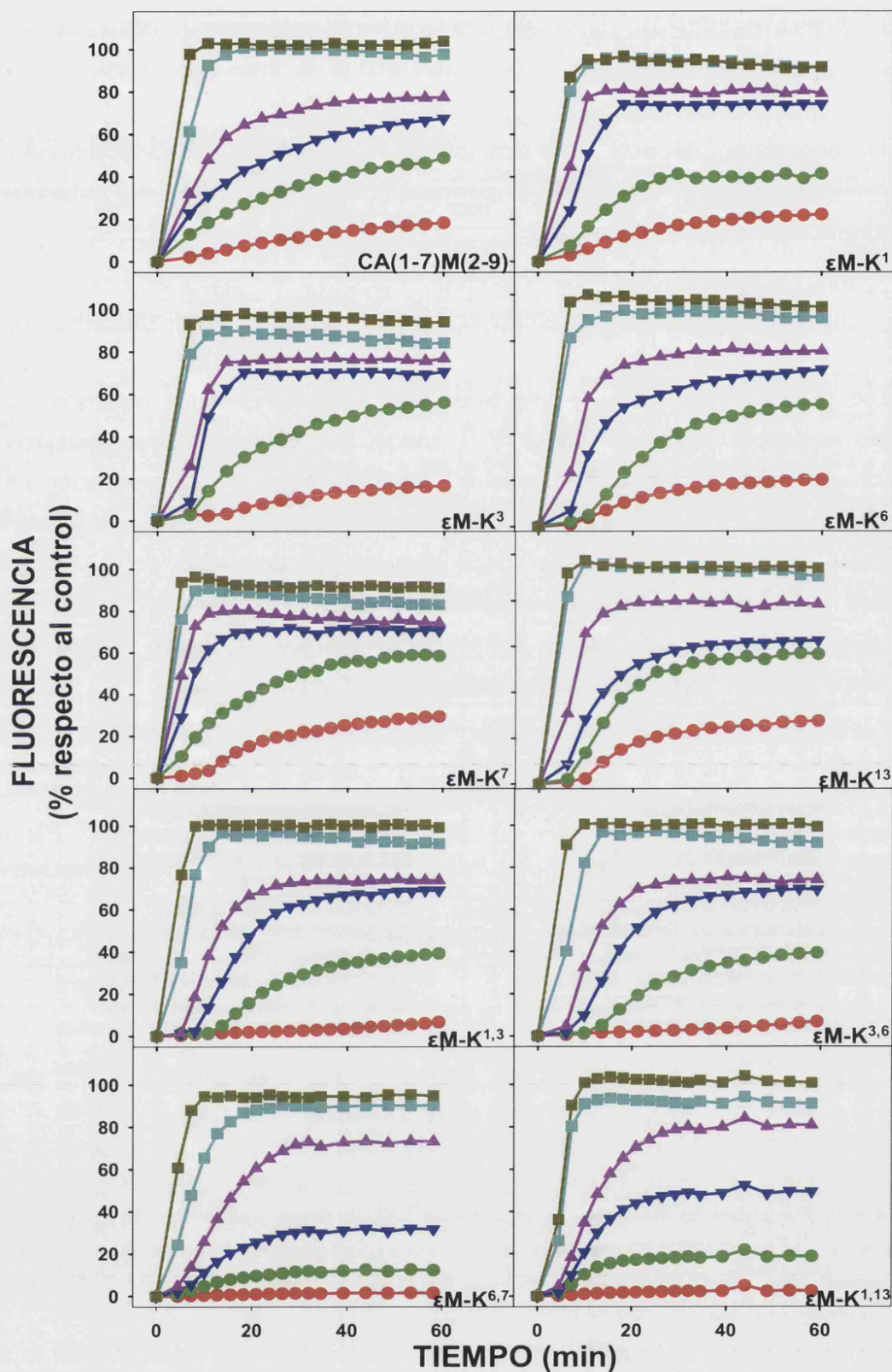


Figura R.14. Variación de la fluorescencia de SYTOX Green con la concentración de CA(1-7)M(2-9) y análogos con Lys trimetiladas en *A. baumannii* ATCC 19606 S^C. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 0.1% Triton X-100 + 4 μ M CA(1-8)M(1-18).

Concentración de péptido (μ M) —●— 0.5 —●— 1.0 —●— 1.5 —●— 2.0 —■— 4.0 —■— 6.0

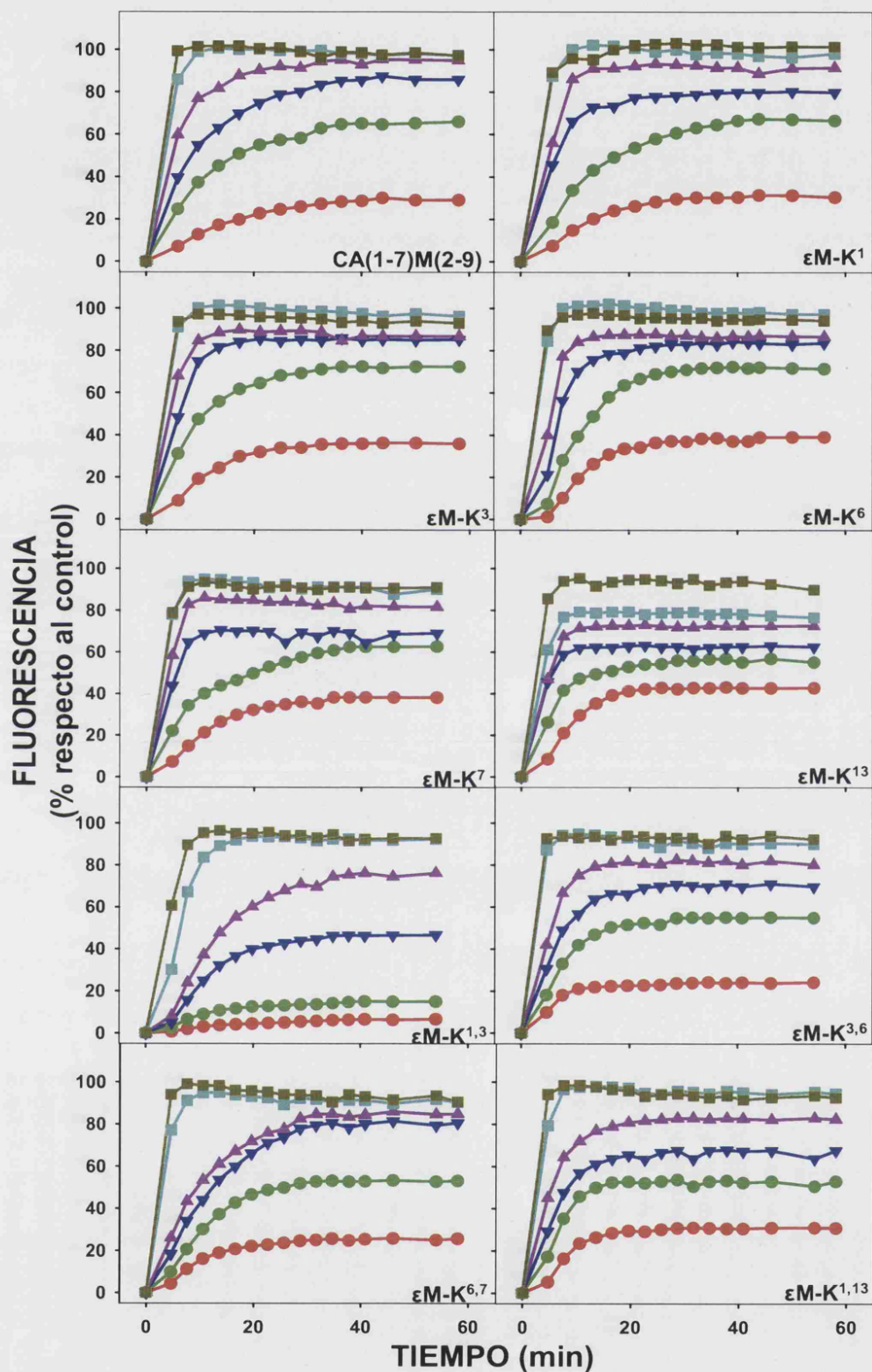


Figura R.15. Variación de la fluorescencia de SYTOX Green con la concentración de CA(1-7)M(2-9) y análogos con Lys trimetiladas *A. baumannii* ATCC 19606 R^C. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 0.1% Triton X-100 + 4 μM CA(1-8)M(1-18).

Concentración de péptido (μM) —●— 0.5 —●— 1.0 —▼— 1.5 —▲— 2.0 —■— 4.0 —■— 6.0

Resultados y discusión

• Variación del potencial de membrana interna.

El estudio de la variación de potencial de membrana interna de bacterias se realizó con la sonda Disc₃(5) (apartado 3.8.1). Tras la adición de los péptidos se produjo un incremento de fluorescencia dependiente de concentración en las cepas de *A. baumannii* sensible y resistente a colistina (figuras R.18 y R.19, S^C y R^C respectivamente). En la figura R.17 se muestra el porcentaje de fluorescencia tras 30 min de incubación del péptido a una concentración constante (1.5 µM) en las dos cepas de *A. baumannii* estudiadas. El patrón no muestra una tendencia consistente, aunque los derivados con dos lisinas trimetiladas, poseen una menor capacidad de permeabilización que los monosustituídos, al menos en la cepa susceptible, mientras que la en resistente dicha tendencia es considerablemente más errática

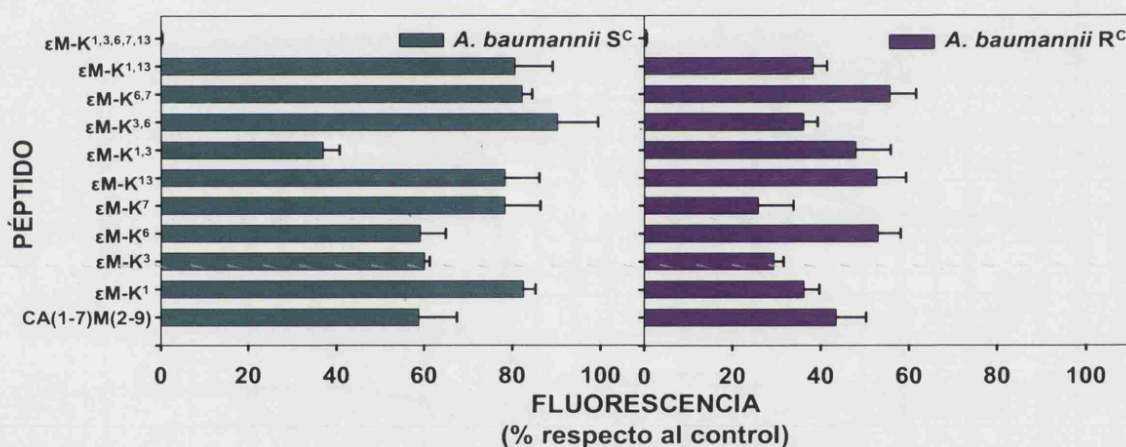


Figura R.17. Porcentaje de fluorescencia de la sonda Disc₃(5) tras incubación (30 min) de *A. baumannii*, cepas ATCC 19606 S^C y R^C con CA(1-7)M(2-9) y análogos con Lys trimetiladas a una concentración final de 1.5 µM. Los resultados se expresan como % de fluorescencia obtenida con 0.1% de Triton-X100 + 4µM CA(1-8)M(1-18), considerada como desporalización total.

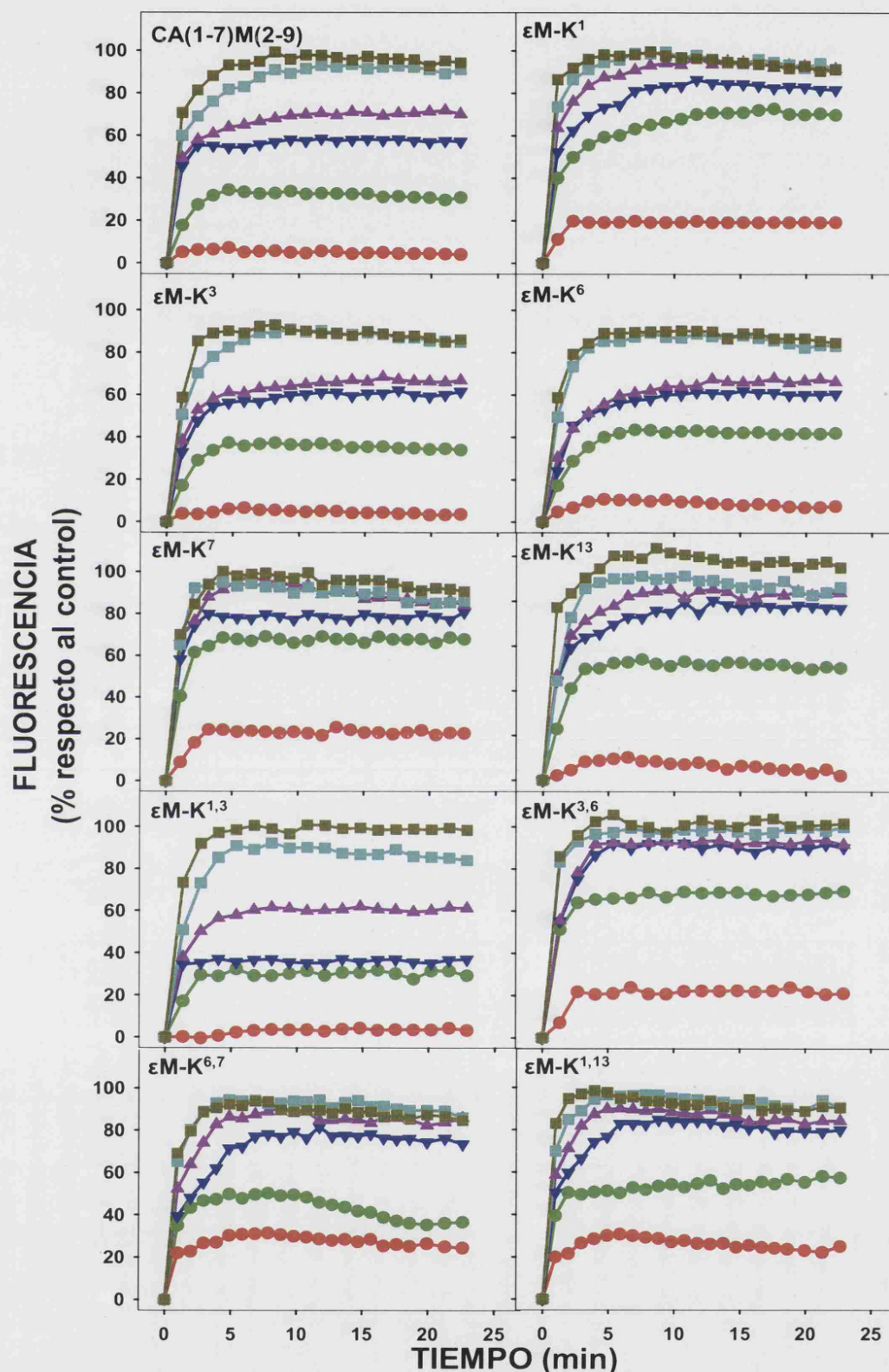


Figura R.18. Variación de la fluorescencia de la sonda Disc3(5) en *A. baumannii* ATCC 19606 S^C tras la adición de CA(1-7)M(2-9) y de sus análogos con Lys trimetiladas. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 0.1% Triton X-100 + 4 μM CA(1-8)M(1-18).

Concentración de péptido (μM). ● 0.5 ● 1.0 ▼ 1.5 ▲ 2.0 ■ 4.0 ■ 6.0

Resultados y discusión

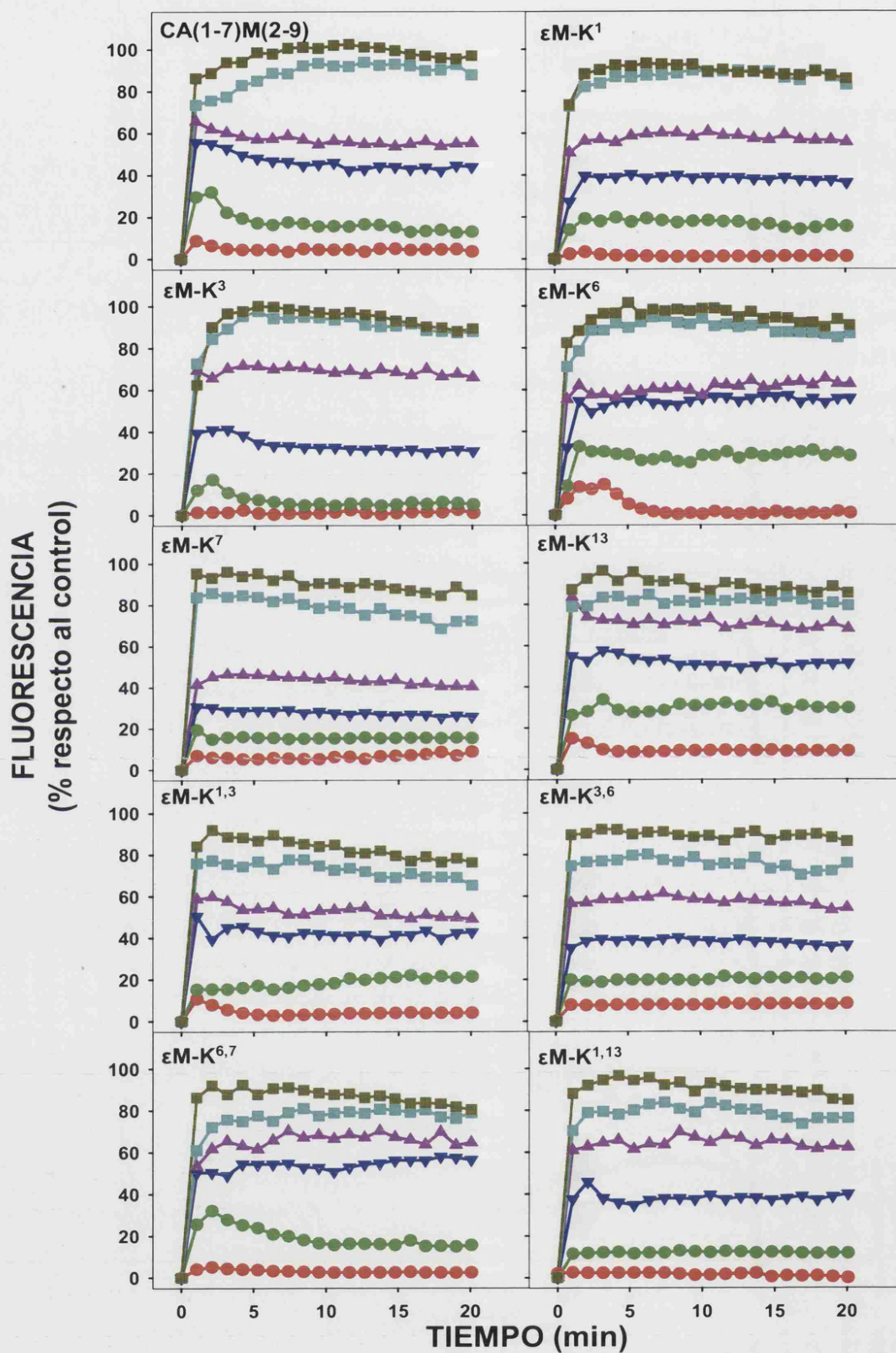


Figura R.19. Variación de la fluorescencia de la sonda Disc3(5) en *A. baumannii* ATCC 19606 R^C tras la adición de CA(1-7)M(2-9) y de sus análogos con Lys trimetiladas. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 0.1% Triton X-100 + 4 μM CA(1-8)M(1-18).

4.1.3. DISCUSIÓN.

Las modificaciones postraduccionales se encuentran estrictamente reguladas en todos los procesos biológicos por la dependencia de una determinada respuesta biológica con el tipo de modificación acontecida. En los últimos años se ha demostrado la importancia de la metilación de Lys como modificación postraduccional. Se ha descrito su papel como modulador epigenético del estado transcripcional de la cromatina, por ejemplo la metilación de histonas, llevada a cabo por las metil transferasas de histonas (HMTs), implica la activación o represión de la transcripción de determinados genes (Daniel *et al.*, 2005), y se ha demostrado que dichas enzimas se asocian a diversos tipos de cáncer (Schneider *et al.*, 2002). También se ha descrito el papel regulador de la metilación de Lys en la actividad de factores de transcripción; tales como el receptor de estrógenos alpha (ER) que es metilado por la lisina metil transferasa SET7 en su residuo 302, con reclutamiento de la maquinaria transcripcional necesaria para activar la transcripción de genes críticos en el desarrollo de las glándulas mamarias (Subramanian *et al.*, 2008). La metilación o desmetilación de Lys del factor de transcripción p53 va a incrementar o suprimir respectivamente su actividad transcripcional dependiendo del residuo en el que suceda la modificación (Scoumanne y Chen, 2008). La actividad del factor de transcripción NF-kB, implicado en la respuesta inmune e inflamatoria, está regulada por la metilación de su subunidad RelA (Yang *et al.*, 2009). Todas estas modificaciones crean motivos de reconocimiento específicos en las proteínas, de los que dependerá el tipo de respuesta biológica que suceda.

Sin embargo, los requerimientos de especificidad de PAEs con lisinas metiladas son mucho menores; la acción del péptido dependerá inicialmente del reconocimiento entre las membranas aniónicas del patógeno y el péptido catiónico, independientemente de su diana final. Un paso previo a esta interacción es el control de los niveles de péptido disponibles en el medio, regulada tanto por las enzimas proteolíticas del propio patógeno, (Bachrach *et al.*, 2008; Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004) como por las peptidasas presentes en los fluidos biológicos. La suma de ambos efectos puede alterar sustancialmente la efectividad global del péptido (Giuliani *et al.*, 2008). P. P. DeLuca y colaboradores realizaron un estudio donde la monometilación de la Lys 6 del decapeptido KSL incrementa su estabilidad en presencia de saliva humana, tras 5 minutos de incubación la degradación fue cuatro veces inferior a la del péptido no metilado (Na *et al.*, 2007). La estabilidad de un péptido en un fluido biológico, donde está en contacto permanente con estos sistemas de degradación, es clave para su actividad *in vivo*. Los datos obtenidos por el grupo del Prof. D. Andreu

Resultados y discusión

indican que el enlace entre las Lys⁶-Lys⁷ de CA(1-7)M(2-9) es el más vulnerable a la degradación por tripsina con un incremento significativo de la estabilidad de los análogos cuando se incorporan lisinas trimetiladas, y paralelo al número de residuos sustituidos. Entre los análogos mono-sustituidos destaca ϵ -MK⁷ que dobla la de CA(1-7)M(2-9). El análogo pan-trimetilado fue insensible a la incubación con la enzima durante 1 h. Sin embargo, la estabilidad proteolítica no es suficiente para explicar los resultados de actividad y de IT obtenidos en nuestro estudio.

Una explicación más adecuada reside en los cambios estructurales provocados por la trimetilación, que afectan a la interacción entre el péptido antibiótico y la membrana, su diana final. Existe abundante literatura sobre la permeabilización de membrana por los híbridos cecropina A-melitina como su mecanismo letal para una amplia variedad de patógenos (Chicharro *et al.*, 2001; Diaz-Achirica *et al.*, 1998; Luque-Ortega *et al.*, 2003; Saugar *et al.*, 2002). Sin embargo, un estudio realizado recientemente con el péptido BP100, derivado de un péptido híbrido cecropina A-melitina de 11 aminoácidos, sobre membranas artificiales, sugiere su actuación como péptido penetrante de células, con posibilidad de interacción con hipotéticas dianas intracelulares (Ferre *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que la permeabilización de la membrana plasmática del patógeno es la base del mecanismo letal de este grupo de péptidos. Tanto en células eucariotas como en procariotas existe despolarización de la membrana del patógeno tras la adición del péptido, por disipación de gradientes Na⁺ y K⁺, aunque también inducen lesiones suficientemente grandes para permitir la entrada a la célula de la sonda vital SYTOX Green. Conforme a la cinética del incremento de fluorescencia observado tras la adición del péptido, éste actúa rápidamente, lo que en cierto modo evitaría una degradación proteolítica masiva previa a su interacción con la membrana.

En *Leishmania* las lesiones generadas en la membrana plasmática conducen a una disminución significativa y rápida de los niveles de ATP intracelulares, con colapso bioenergético y pérdida irreversible de la homeostasis interna del parásito. El cociente EC₅₀/LD₅₀ próximo a 1 en la mayoría de los casos (tabla R.2), confirma que el daño es irreversible, e implica la incapacidad de reparación de la célula tras 4 h de incubación. Quizás el ensayo que mejor ilustra el efecto de los compuestos sobre las células es el de microscopía electrónica (Fig. R.12), donde se aprecia la permeabilización de membrana plasmática y pérdida del material citoplasmático de promastigotes tras 4h de incubación con el péptido, efecto típico de PAEs activos en membrana (Diaz-Achirica *et al.*, 1998; Guerrero *et al.*, 2004; Luque-Ortega *et al.*, 2003). En las microfotografías se observa que la permeabilización de membrana en los parásitos sucede bajo un patrón todo o nada; existe una pequeña población que permanece

Resultados y discusión

intacta tras la acción del péptido, junto con una mayoritaria totalmente permeabilizada, confirmado mediante el ensayo de citofluorimetría, donde la incorporación de la sonda SYTOX Green demuestra la presencia de dichas poblaciones. Este patrón ya ha sido descrito anteriormente en *Leishmania* con otros PAEs, como análogos de la magainina (Guerrero *et al.*, 2004), o en permeabilización de liposomas como modelo de membranas artificiales, tanto para los péptidos parentales melitina y cecropina A, como en péptidos híbridos cecropina A-melitina. En vesículas unilamelares de POPC (Palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina) cargadas con calceína la melitina provocó la liberación del fluoróforo de sólo una parte de las mismas permaneciendo el resto inalterada (Benachir y Lafleur, 1995). Idéntico mecanismo fue descrito para la cecropina A ensayada sobre vesículas mixtas POPC/POPG (Palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina/Palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol) (Gregory *et al.*, 2008), y el péptido híbrido CA(1-8)M(1-18) actuó de manera “todo o nada” sobre vesículas de PS (fosfatidilserina) y PC (fosfatidilcolina) (Mancheno *et al.*, 1996), extendido a CA(1-7)M(2-9), ensayado en vesículas fosfolípídicas (Bastos *et al.*, 2008). Por otro lado la trimetilación de Lys no supuso alteración significativa del patrón “todo o nada” observado para el péptido parental.

Tras establecer que el mecanismo de acción de los análogos trimetilados de CA(1-7)M(2-9) se basa en la permeabilización de la membrana plasmática, la cuestión que surge es cómo la trimetilación de lisinas afecta al citado proceso. La trimetilación disminuye tanto la actividad microbiciada en *Leishmania* y en bacterias como la citotoxicidad del péptido. Por otro lado, dicha disminución se relaciona directamente con el número de Lys sustituidas con pérdida completa de actividad con la trimetilación de todas las Lys del péptido. Resultados similares han sido descritos en la melitina; el análogo pan-trimetilado perdió toda su actividad hemolítica (Ramalingam y Bello, 1992), mientras que el pan-dimetilado sólo causó una reducción parcial (Dempsey *et al.*, 1987). En la lactoferricina la trimetilación de un solo residuo de Lys disminuyó su actividad frente a *S. aureus* y *E. coli* (Haug *et al.*, 2007).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la trimetilación de Lys preserva la carga neta del péptido, sin embargo produce un incremento del volumen de la cadena lateral, como consecuencia, la densidad de carga disminuye y por tanto se reduce la interacción electrostática entre la cadena lateral de las Lys y los fosfatos del LPS de la membrana externa de Gram-negativas o de las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana. En este caso se debería esperar un deterioro igual o mayor en la interacción con membranas aniónicas que en las zwitteriónicas, es decir que la actividad microbiciada sufriría una disminución igual o superior a la hemolítica, sin embargo los datos experimentales apuntan en dirección contraria. Otro aspecto

Resultados y discusión

sustancial de la trimetilación es el hipotético aumento que ésta produce en la hidrofobicidad del péptido, sin embargo, los datos experimentales (tabla R.1) muestran que, todos los análogos eluyeron ligeramente más rápido de la columna de fase reversa HPLC que el péptido parental, teóricamente con menor hidrofobicidad funcional. Este resultado explica la menor citotoxicidad observada en todos los compuestos respecto al péptido parental. Dado que la membrana plasmática de los eritrocitos está compuesta de fosfolípidos zwitteriónicos la inserción del péptido en la membrana estaría controlada por su hidrofobicidad más que por una interacción electrostática, por lo que su inserción en la membrana será menor que la de CA(1-7)M(2-9), lo que explicaría la menor capacidad hemolítica y las diferencias de IT observadas.

Finalmente, la trimetilación supone un incremento de volumen de la cadena lateral de lisina, que influenciaría la estructuración del péptido; aunque los péptidos cecropina A-melitina se encuentran desestructurados en solución acuosa, en contacto con la membrana adoptan hélice α . Dicho proceso ha sido estudiado en vesículas lipídicas y en membranas modelo, siendo el cambio de conformación clave para su actividad (Abrunhosa *et al.*, 2005; Andreu *et al.*, 1992; Bhargava y Feix, 2004). En la unión de CA(1-7)M(2-9) a la membrana se estructura como una hélice α paralela a la bicapa, en la interfase entre el medio acuoso y la matriz hidrofóbica, las cadenas laterales de Lys interaccionan con los grupos fosfato de los fosfolípidos, mientras que los residuos hidrofóbicos se insertan en la matriz hidrofóbica (Abrunhosa *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2008; Bhargava y Feix, 2004). Los resultados de RMN de los análogos ϵ M-K¹, ϵ M-K^{1,3} y ϵ M-K^{1,3,6,7,13} (Fig. R.20) muestran que el efecto de la trimetilación de Lys sobre la conformación de CA(1-7)M(2-9) origina una desestructuración de la zona donde se realiza, y dicho efecto se incrementa con el número de Lys sustituidas. El contenido de hélice α disminuye con el número de sustituciones, que explicaría la pérdida de actividad asociada al número de Lys modificadas, leve en el caso de análogos monosustituidos, mayor en el caso de la doble sustitución, y total en el caso del análogo completamente trimetilado. De manera semejante, la disminución del porcentaje de α -hélice en diastereómeros lineales de otros PAEs, mediante inclusión de aminoácidos de la serie D, ocasiona una mayor pérdida de citotoxicidad que de actividad microbica (Papo *et al.*, 2002).

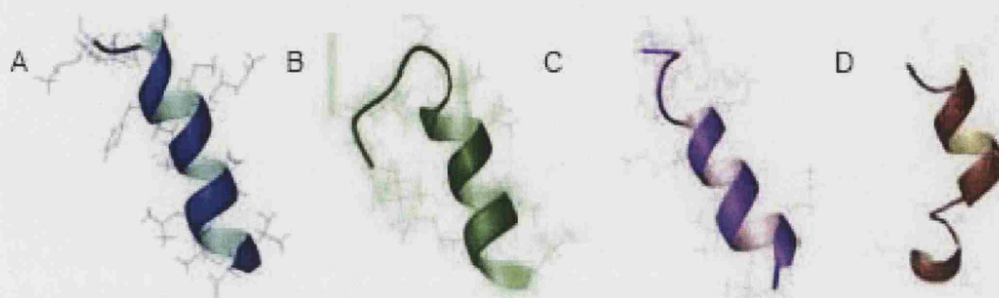


Figura R.20. Estructura 3D de los péptidos determinada por RMN en 30% TFE **A:** CA(1-7)M(2-9), **B:** ϵ M-K¹, **C:** ϵ M-K^{1,3}, **D:** ϵ M-K^{1,3,6,7,13}. Resultados obtenidos por la Dra. Dolores Diaz (CIB.CSIC)

El presente trabajo demuestra la modulación de la actividad de CA(1-7)M(2-9) mediante la ϵ -NH₂ trimetilación de lisinas: i) Disminuye su citotoxicidad. ii) Mejora el IT de los análogos monosustituídos, tanto en *Leishmania* como en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. iii) Disminuye su susceptibilidad a proteasas, por lo que se incrementa su tiempo de vida media en fluidos biológicos. Estas mejoras suponen la superación de dos de los mayores obstáculos en la utilización de los PAEs como fármacos, citotoxicidad e inestabilidad. Por otro lado, y como prueba de concepto, la trimetilación es una herramienta muy útil que podría ser aplicada a otros PAEs, con objeto de mejorar sus propiedades antimicrobianas, aumentando así el número de fármacos activos frente a patógenos multirresistentes.

4.2. ANÁLOGOS DE GRAMICIDINA S CON FENILALANINAS MODIFICADAS Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

4.2.1. INTRODUCCIÓN.

La GS es un decapeptido cíclico compuesto por dos pentapéptidos unidos cabeza-cola [ciclo-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂] cuya estructura y características principales se han descrito en el apartado 1.1.2.1. A pesar de su amplio espectro de acción sobre microorganismos, especialmente frente a Gram-positivos, su uso como antibiótico se restringe a aplicaciones tópicas, por su alta toxicidad en mamíferos (Prenner *et al.*, 1999). Las modificaciones tendentes a la mejora de su especificidad se han realizado tanto en la región de la lámina β como en la de los giros β (Afonin *et al.*, 2003; Grotenbreg *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2005) (ver apartado 1.1.1.1). En el presente trabajo hemos empleado una serie de análogos de GS (serie GS) donde el residuo D-Phe es sustituido por análogos del mismo que preservan su configuración D y cuyo grupo aromático varía en tamaño (Fig. R.21). Adicionalmente se estudió la serie GSX, con inversión de la secuencia del giro β , mediante una sustitución de la secuencia nativa [ciclo-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂] por [ciclo-(Val-Orn-Leu-D-Pro-Phe)₂], donde D-Pro ocupa la posición $i+1$ y Phe la posición $i+2$ del giro β . Se mantuvo la quiralidad respectiva topológica del giro, es decir, D-Phe-Pro se sustituye por D-Pro-Phe. De entre los aminoácidos proteicos Pro es el más adecuado para ocupar la posición $i+1$ de un giro β de tipo I o II (MacArthur y Thornton, 1991) y del mismo modo, su enantiómero D-Pro lo será para situarse en la posición $i+1$ de un giro β de tipo I' o II', por lo que esta inversión pretende la estabilización del giro β . En esta serie, todos los análogos, a excepción de Ac₃C, mantienen la aromaticidad de su cadena lateral, e incluso algunos poseen un grupo fenilo adicional (Fig. R.22). En esta tesis se ha realizado un estudio completo de la actividad biológica de estos análogos, así como la obtención de la manera más precisa posible de relaciones estructura-actividad con los resultados de RMN obtenidos por la Dra. M^a Ángeles Jiménez (Instituto de Estructura de la Materia, CSIC).

Resultados y discusión

4.2.2. RESULTADOS.

4.2.2.1. Análogos de Gramicidina S utilizados en el estudio.

Gramicidina S y serie GS.

La molécula de gramicidina S y los aminoácidos seleccionados como sustitutos del residuo D-Phe en la serie GS se muestran en la figura R.21. Además de la conservación de su configuración D y aromaticidad de su cadena latera, ya mencionadas, las modificaciones consistieron en: i) adición de un grupo metilo (D-Hpa), que aumenta la distancia entre el esqueleto peptídico y el anillo aromático; ii) incorporación de un anillo aromático adicional fusionado al fenilo directamente (D-Nal-1 y D-Nal-2) o no fusionado (D-Dip y D-Flg), en el caso de D-Flg la existencia de un enlace covalente adicional entre ambos anillos aromáticos que impide su libre rotación; iii) formación de un iminoácido derivado cuyo grupo amino es secundario, mediante unión del mismo con el carbono *orto* del fenilo de D-Phe, que restringe la orientación de la cadena lateral, e induce importantes cambios conformacionales en el esqueleto peptídico.

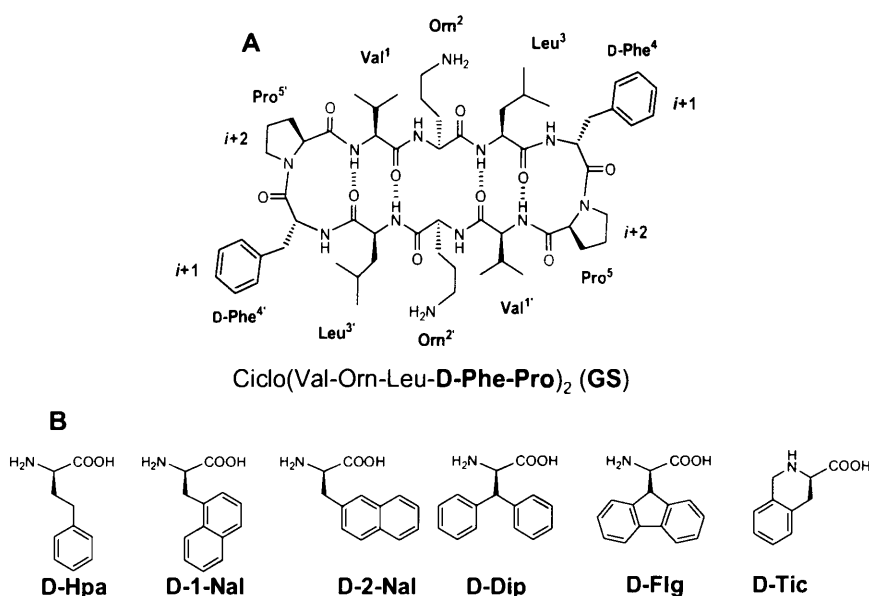


Figura R.21. Estructura de GS (A), y análogos de D-Phe (B). **Hpa**: homofenilalanina, **Nal**: naftilalanina, **Dip**: β,β-difenilalanina, **Flg**: fluorenilglicina, **Tic**: ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico.

Resultados y discusión

Secuencias y masas moleculares de GS y análogos de la serie GS.

La síntesis de gramicidina S y sus análogos fue realizada por la Dra. Concepción Solanas en el grupo del Prof. D. Andreu (Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona), mediante síntesis peptídica en fase sólida aplicando química de tipo Boc. Como resina se empleó la de tipo *Merrifield*. El grado de pureza de los péptidos fue determinado mediante análisis por HPLC y la caracterización se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOF. Todos los péptidos presentaron un grado de pureza superior al 99%. La tabla R.6 muestra la secuencia y masa molecular de gramicidina S y análogos de la serie GS empleados, así como la nomenclatura asignada a cada uno de los péptidos en la presente tesis.

Tabla R.6. Secuencias peptídicas, nomenclatura y masas moleculares de gramicidina S y análogos de GS.

<i>i</i> +1*	Secuencia	Nomenclatura	Masa molecular
D-Phe	ciclo(Val-Orn-Leu- D-Phe -Pro) ₂	GS	1141.45
D-Hpa	ciclo(Val-Orn-Leu- D-Hpa -Pro) ₂	GSHpa	1169.50
D-1-Nal	ciclo(Val-Orn-Leu- D-1-Nal -Pro) ₂	GSNa1	1241.56
D-2-Nal	ciclo(Val-Orn-Leu- D-2-Nal -Pro) ₂	GSNa2	1241.56
D-Dip	ciclo(Val-Orn-Leu- D-Dip -Pro) ₂	GSDip	1293.64
D-Flg	ciclo(Val-Orn-Leu- D-Flg -Pro) ₂	GSFlg	1289.61
D-Tic	ciclo(Val-Orn-Leu- D-Tic -Pro) ₂	GSTic	1165.47

* Aminoácido en posición *i*+1.

Análogo GSX y Serie GSX.

Adicionalmente se ensayó una nueva familia de análogos de GS, donde la secuencia del giro β se invirtió antes de realizar la sustitución del residuo de fenilalanina. La figura R.22 muestra la estructura de GSX (A), donde D-Pro ocupa la posición *i*+1 y Phe la posición *i*+2 del giro β , y los aminoácidos seleccionados para reemplazar al residuo Phe (B). Como sustitutos se seleccionaron inicialmente los aminoácidos Dip, Flg, Tic y los dos enantiómeros de *c*₃diPhe. A excepción de Tic, todos ellos poseen dos anillos aromáticos con orientaciones muy diferentes entre sí. El análogo Ac₃c, fue utilizado para conocer la restricción intrínseca impuesta por el anillo ciclopropanico. Finalmente, se estudiaron los cuatro estereoisómeros del aminoácido *c*₃Phe, así como el resultante de la apertura del ciclopropano (α Me)Phe.

Resultados y discusión

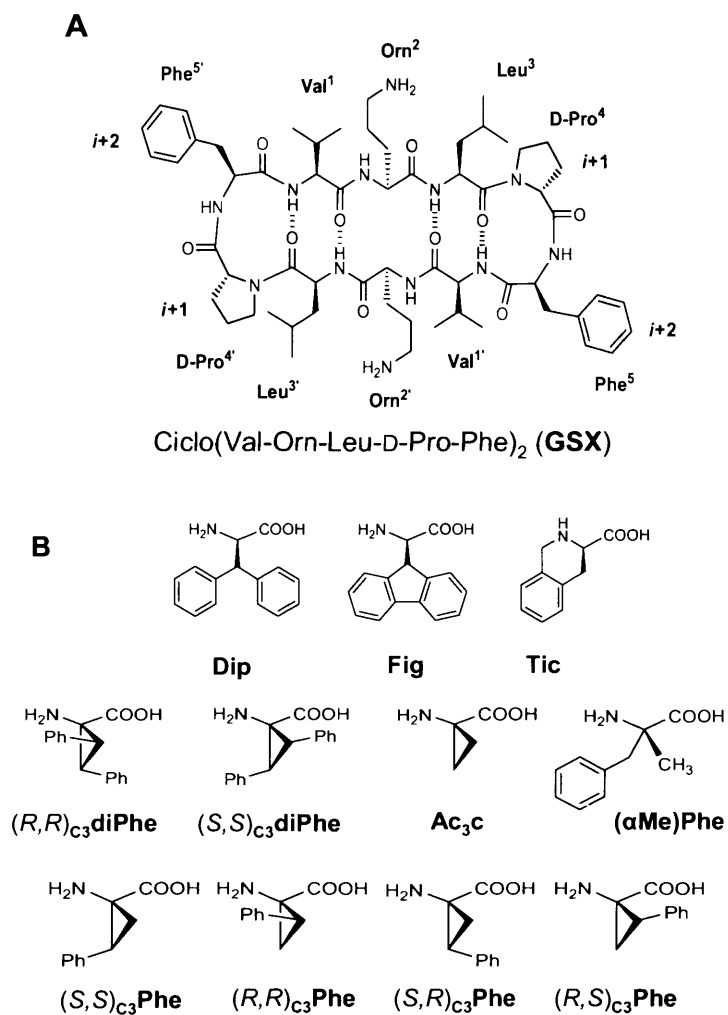


Figura R.22. Estructura de GSX (A), y análogos de D-Phe para esta serie (B).

Secuencias y masas moleculares de GSX y análogos de la serie GSX.

La tabla R.7 muestra la secuencia y masa molecular del análogo de gramicidina S GSX, donde D-Pro ocupa la posición *i*+1 y Phe la posición *i*+2 del giro β, y los análogos obtenidos a partir del mismo, así como la nomenclatura asignada a cada uno de estos péptidos en la presente tesis.

Resultados y discusión

Tabla R.7. Secuencias peptídicas, nomenclatura y masas moleculares de GSX y análogos de GSX.

<i>i</i> +2*	Secuencia	Nomenclatura	Masa molecular
Phe	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- Phe) ₂	GSX	1141.45
Dip	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- Dip) ₂	GSXDip	1293.64
Fig	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- Fig) ₂	GSXFig	1289.61
Tic	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- Tic) ₂	GSXTic	1165.47
(R,R)c₃diPhe	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- (R,R)c₃diPhe) ₂	GSXJ	1317.66
(S,S)c₃diPhe	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- (S,S)c₃diPhe) ₂	GSXU	1317.66
Ac₃c	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- Ac₃c) ₂	GSXZ	1013.28
(S,S)c₃Phe	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- (S,S)c₃Phe) ₂	GSXc1	1165.47
(R,R)c₃Phe	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- (R,R)c₃Phe) ₂	GSXc2	1165.47
(S,R)c₃Phe	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- (S,R)c₃Phe) ₂	GSXt1	1165.47
(R,S)c₃Phe	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- (R,S)c₃Phe) ₂	GSXt2	1165.47
(αMe)Phe	ciclo(Val-Orn-Leu-D-Pro- (αMe)Phe) ₂	GSXMePhe	1169.50

* Aminoácido en la posición *i*+2.

4.2.2.2. Actividad de Gramicidina S y análogos de la serie GS en *Leishmania* y eritrocitos de carnero.

4.2.2.2.1. Evaluación de la viabilidad del parásito.

El efecto leishmanicida de la Gramicidina S y de sus análogos se evaluó mediante la inhibición de la capacidad de reducción de MTT de los parásitos. Todos los péptidos ensayados inhibieron la viabilidad de promastigotes y amastigotes de manera dependiente de la concentración en rango micromolar, tanto en ensayo a corto plazo (4 h) como en inhibición de la proliferación (72 h). La figura R.23 muestra la dependencia de la inhibición de reducción de MTT con la concentración. La similitud entre las curvas de inhibición a 4 h y proliferación, demuestra que el daño producido tras las 4 h es irreversible.

Resultados y discusión

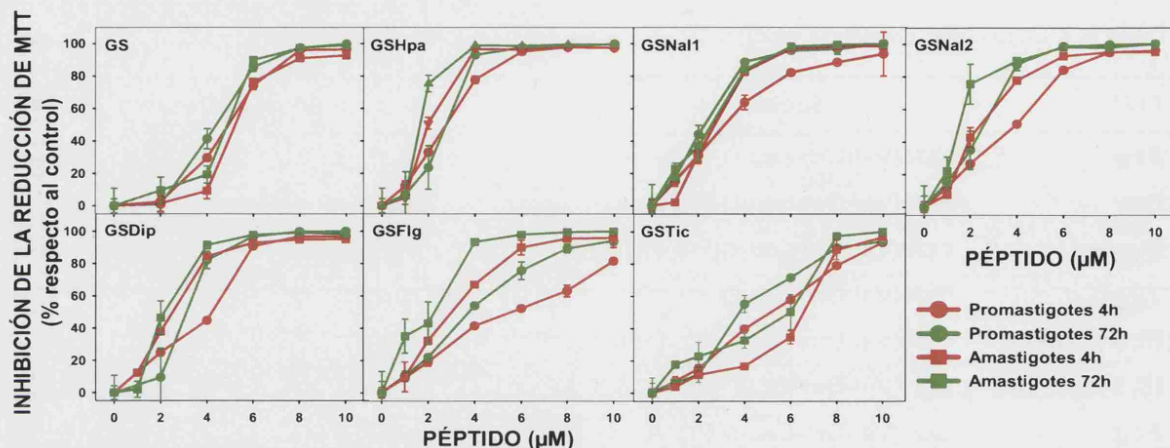


Figura R.23. Inhibición de la reducción de MTT por Gramicidina S y sus análogos (serie GS) en promastigotes de *L. donovani* y de amastigotes de *L. pifanoi*. Curvas de Inhibición a 4h y 72h.

Los valores de EC_{50} y LC_{50} calculados a partir de las curvas de inhibición anteriores se muestran en la tabla R.8. Los análogos de gramicidina S son leishmanicidas en un rango de concentración similar a la del péptido parental; en amastigotes existe una ligera mejora de actividad para todos los análogos, excepto de GSTic que presenta una pequeña pérdida de actividad respecto a GS. En promastigotes GSHpa, GSNa1 y GSNa2 son más activos, el resto de análogos mantienen valores muy próximos a GS.

Tabla R.8. Actividad leishmanicida de GS y análogos de la serie GS.

Péptido	*D-Phe ^{4,4'}	**Promastigotes		**Amastigotes	
		EC_{50}	LC_{50}	EC_{50}	LC_{50}
GS	D-Phe	4.8 (± 0.1)	4.3 (± 0.2)	5.1 (± 0.1)	4.7 (± 0.1)
GSHpa	D-Hpa	2.5 (± 0.1)	2.5 (± 0.0)	1.9 (± 0.0)	1.6 (± 0.0)
GSNa1	D-1-Nal	2.9 (± 0.1)	2.1 (± 0.1)	2.5 (± 0.1)	2.4 (± 0.2)
GSNa2	D-2-Nal	3.5 (± 0.5)	2.4 (± 0.0)	2.2 (± 0.1)	1.4 (± 0.1)
GSDip	D-Dip	4.2 (± 0.4)	3.0 (± 0.1)	2.3 (± 0.1)	2.0 (± 0.1)
GSFlg	D-Flg	5.3 (± 1.4)	3.7 (± 0.1)	3.0 (± 0.1)	1.9 (± 0.4)
GSTic	D-Tic	5.3 (± 0.6)	3.8 (± 0.0)	6.5 (± 0.2)	6.2 (± 0.4)

*D-Phe es sustituido por su análogo indicado. EC_{50} y LC_{50} (µM). ** (± Desviación estándar). Promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.

4.2.2.2. Citotoxicidad de los péptidos e Índice Terapéutico.

Conforme al apartado 4.1.2.2 el efecto citotóxico de los péptidos se evaluó mediante hemólisis, medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de carnero al medio tras 4h de incubación con los compuestos. Todos los análogos de la serie GS resultaron ser más citotóxicos que el péptido parental, a excepción del análogo GSTic cuya hemólisis fue significativamente menor que el resto de análogos (fig. R.24). Sus respectivas HC_{50} e IT se recogen en la tabla R.9. La mejora del IT tanto en promastigotes de *L. donovani* como en amastigotes de *L. pifanoi* se debe esencialmente a la menor toxicidad de GSTic respecto a la gramicidina S.

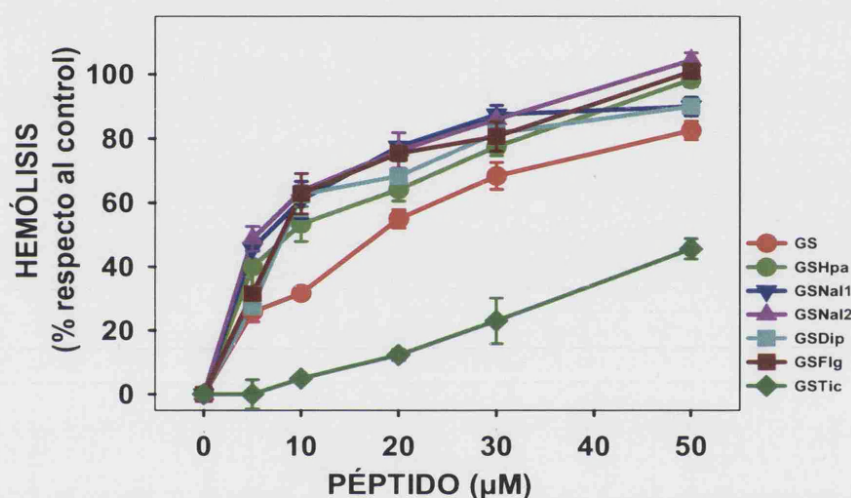


Figura R.24. Actividad de Gramicidina S y análogos de la serie GS sobre eritrocitos de carnero. El 100% de hemólisis se obtuvo con 0.1% TX-100.

Tabla R.9. Actividad hemolítica e Índice terapéutico en *Leishmania* de GS y análogos serie GS

Péptido	*D-Phe ^{4,4'}	**Índice Terapéutico		***Eritrocitos
		Promastigotes	Amastigotes	HC ₅₀
GS	D-Phe	4.9 (1.0)	4.4 (1.0)	21.1 (± 2.6)
GSHpa	D-Hpa	2.8 (0.6)	4.3 (0.9)	7.0 (± 0.3)
GSNa1	D-1-Nal	2.3 (0.5)	2.1 (0.5)	5.0 (± 0.1)
GSNa2	D-2-Nal	2.9 (0.6)	4.9 (1.1)	7.1 (± 3.5)
GSDip	D-Dip	2.9 (0.6)	4,5 (1.0)	9.0 (± 1.1)
GSFlg	D-Flg	1.6 (0.3)	3.2 (0.7)	6.2 (± 0.3)
GSTic	D-Tic	13.4 (2.7)	8.2 (1.9)	51.0 (± 3.6)

*D-Phe es sustituido por el aminoácido indicado. índice terapéutico (IT) $IT = HC_{50} / LC_{50}$.

** Entre paréntesis valor normalizado respecto al péptido parental. HC_{50} (μM). ***(± Desviación estándar) Promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.

Resultados y discusión

4.2.2.2.3. Alteraciones en la membrana plasmática de promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.

- Alteraciones morfológicas. Microscopía electrónica.

El ensayo se realizó sobre promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*. Los péptidos estudiados fueron GS y GSTic, este último seleccionado por presentar el mejor IT. El ensayo se realizó en condiciones estándar (3.8.4.) a una concentración de péptido cercana a la EC_{50} . En amastigotes se observa la formación de ampollas en la membrana plasmática e incipiente vacuolización del citoplasma, mientras que en promastigotes se observan dos poblaciones una con mayor vacuolización del citoplasma y desorganización de orgánulos intracelulares, mientras que la otra permanece inalterada tras la incubación con el péptido, bajo un patrón “todo o nada” (fig. R.25).

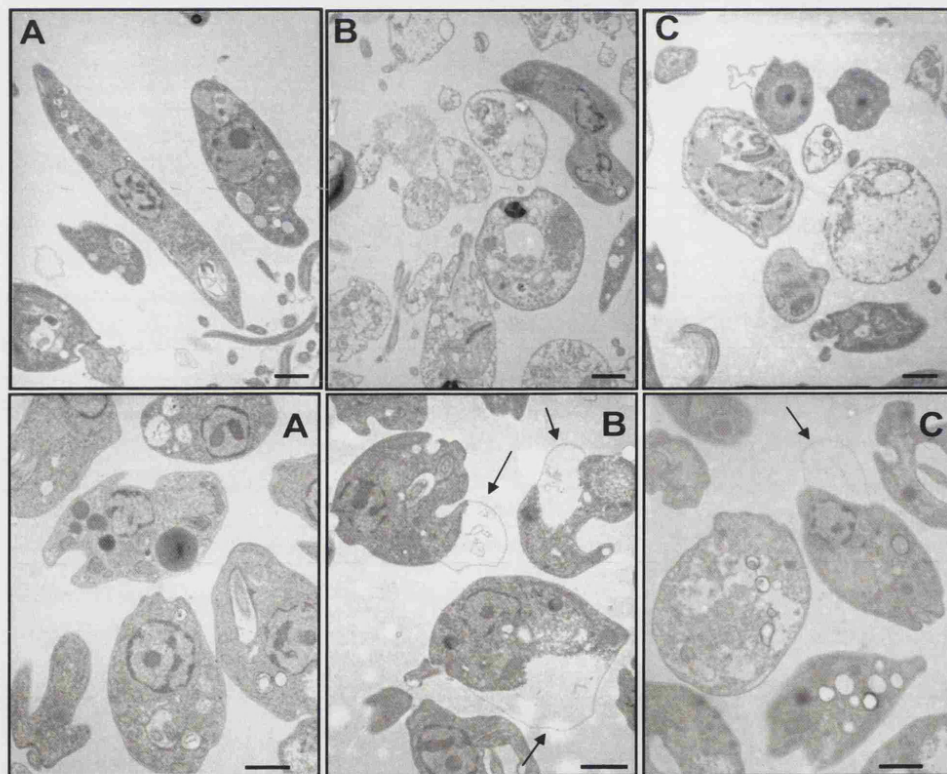


Figura R.25. Microscopía electrónica de transmisión de promastigotes de *L. donovani* (panel superior) y de amastigotes de *L. pifanoi* (panel inferior) tratados con GS y análogos a una concentración que causa aproximadamente el 50% de inhibición de viabilidad ($5 \mu\text{M}$). Barra de aumento = $1 \mu\text{m}$. Las flechas indican las ampollas formadas en la membrana plasmática debido a la acción del péptido. A: Control, B: GS C: GSTic.

- Permeabilización de la membrana plasmática de *Leishmania*.

GS Y GSTic permeabilizaron la membrana plasmática de promastigotes y amastigotes de manera dependiente de la concentración, sin embargo existen diferencias entre ambos péptidos, para una concentración dada, GS logra una mayor permeabilización y una cinética más rápida que GSTic, a pesar de que la EC_{50} de ambos compuestos es muy similar (fig. R.26).

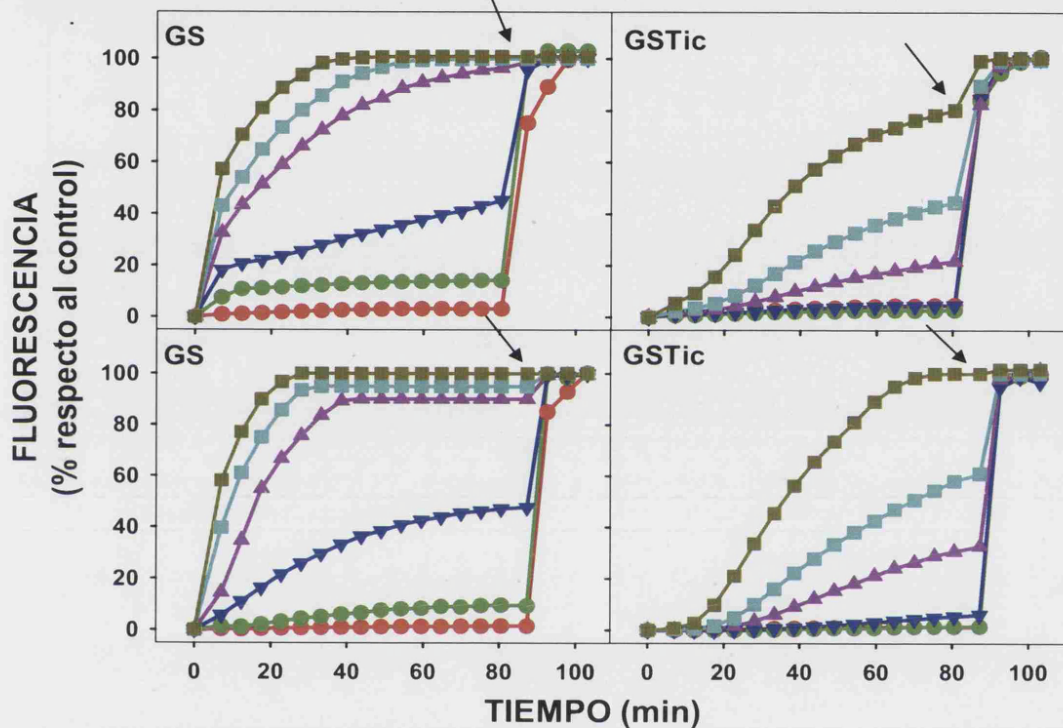


Figura R.26. Variación de la fluorescencia de SYTOX Green tras la adición de péptidos en promastigotes de *L. donovani* (panel superior) y amastigotes de *L. pifanoi*. (panel inferior). Las flechas indican la adición de 0.1% de TX-100. Concentración de péptido (μ M). ● 1 ● 2 ▼ 4 ▲ 6 ■ 8 ■ 10

- Despolarización de la membrana plasmática del parásito.

Tanto GS como GSTic despolarizaron la membrana plasmática del parásito (promastigotes y amastigotes) de forma dependiente de la concentración, la figura R.27 muestra la cinética del incremento de fluorescencia de la sonda bisoxonol tras la adición del péptido.

Resultados y discusión

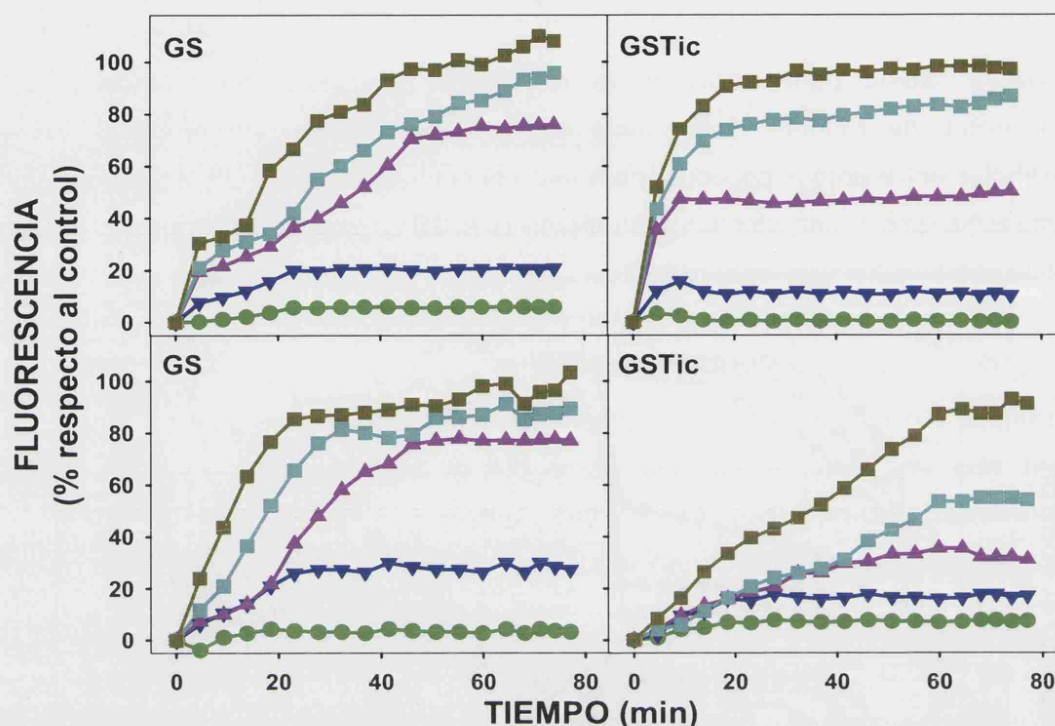


Figura R.27. Variación de la fluorescencia de bisoxonol tras la adición de péptidos a promastigotes de *L. donovani* (panel superior) y amastigotes de *L. pifanoi* (panel inferior). El 100% de fluorescencia se obtuvo con 5 μ M de CA(1-8)M(1-18). Concentración de péptido (μ M). ● 2 ▼ 4 ▲ 6 ■ 8 ■ 10

• Variación de los niveles de ATP intracelular.

El efecto de GS y GSTic sobre la membrana plasmática de promastigotes causó disminución de los niveles intracelulares de ATP, dependiente de la concentración de péptido, GS mostró una cinética más rápida y una mayor disminución de luminiscencia que GSTic. (Fig.28).

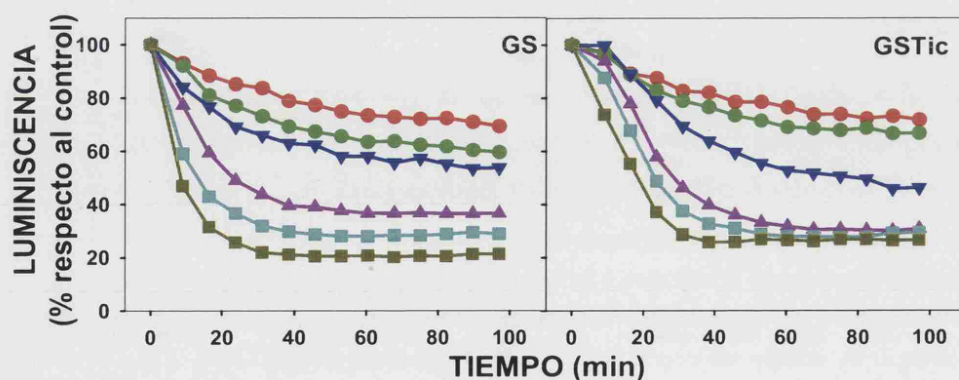


Figura R.28. Disminución de luminiscencia en promastigotes de *L. donovani* 3-Luc tras la adición de GS y GSTic a diferentes concentraciones. Concentración de péptido (μ M) ● 1 ● 2 ▼ 4 ▲ 6 ■ 8 ■ 10

Resultados y discusión

4.2.2.3. Actividad bactericida de Gramicidina S y análogos de la serie GS.

4.2.2.3.1. Evaluación de la viabilidad bacteriana y cálculo de la CMI.

La actividad de la gramicidina S y de sus análogos se evaluó sobre bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) y Gram-negativas, (cepas sensible y resistente a colistina de *A. baumannii*). El método empleado para la determinación de la CMI se ha descrito en el apartado 3.5.2. Los resultados obtenidos se recogen en tablas R.10 y R.11.

Tabla R.10. Actividad de GS y análogos serie GS sobre bacterias Gram-negativas.

Péptido	*D-Phe ^{4,4'}	**A. baumannii S^C		**A. baumannii R^C	
		CMI	CMI ₅₀	CMI	CMI ₅₀
GS	D-Phe	15.0	10.1 (± 0.4)	20.0	13.1 (± 0.0)
GSHpa	D-Hpa	6.0	4.6 (± 0.1)	8.0	6.2 (± 0.1)
GSNa1	D-1-Nal	N.D	35.9 (± 0.0)	N.D	>40.0
GSNa2	D-2-Nal	N.D	39.6 (± 0.0)	N.D	>40.0
GSDip	D-Dip	15.0	9.6 (± 0.9)	20.0	17.8 (± 0.0)
GSFlg	D-Flg	40.0	15.4 (± 1.3)	N.D	>40.0
GSTic	D-Tic	N.D	>40.0	N.D	>40.0

*D-Phe es sustituido por el aminoácido indicado. CMI y CMI₅₀ (µM) ** (± Desviación estándar).

S^C: *A. baumannii* ATCC 19606 sensible a colistina, R^C: *A. baumannii* ATCC 19606 resistente a colistina.

Tabla R.11. Actividad de GS y análogos serie GS sobre bacterias Gram-positivas.

Péptido	*D-Phe ^{4,4'}	**S. aureus		**L. monocytogenes	
		CMI	CMI ₅₀	CMI	CMI ₅₀
GS	D-Phe	10.0	7.9 (± 0.8)	11.0	6.7 (± 0.2)
GSHpa	D-Hpa	6.0	3.5 (± 0.1)	5.0	2.4 (± 0.0)
GSNa1	D-1-Nal	6.0	2.9 (± 0.5)	15.0	8.6 (± 0.6)
GSNa2	D-2-Nal	10.0	4.6 (± 0.6)	12.0	7.8 (± 0.4)
GSDip	D-Dip	6.0	3.4 (± 0.0)	12.0	7.7 (± 0.6)
GSFlg	D-Flg	25.0	8.0 (± 0.3)	20.0	9.2 (± 1.4)
GSTic	D-Tic	8.0	4.9 (± 0.4)	11.0	8.3 (± 0.5)

*D-Phe es sustituido por el aminoácido indicado. CMI y CMI₅₀ (µM) ** (± Desviación estándar). ND.: No determinado.

Resultados y discusión

En bacterias Gram-negativas el único análogo que supera al péptido parental es GSHpa, el análogo GSDip tiene valores de CMI₅₀ próximos a GS, mientras que el resto de análogos presentan una pérdida total o parcial de actividad sobre este modelo. La cepa *A. baumannii* R^C es más resistente a todos los péptidos estudiados que su isogénica *A. baumannii* S^C.

Tanto la gramicidina S como el resto de análogos son más activos sobre Gram-positivas que negativas, sobre estas últimas el análogo GSHpa también fue el más activo de los estudiados, el resto de análogos mostraron valores de CMI₅₀ similares a GS, a excepción de GSFlg con una ligera disminución de actividad sobre las especies Gram-positivas.

4.2.2.3.2. Índice terapéutico de los péptidos en bacterias.

Los valores de IT calculados para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas aparecen en la tabla R.12. Los valores de HC₅₀ empleados en el cálculo del IT son los obtenidos para Gramicidina S y sus análogos de la serie GS, apartado 4.2.2.2. El IT en Gram-negativas no mejora en ningún caso, sin embargo GSTic si lo hace significativamente en Gram-positivas, duplicándose para *L. monocytogenes* y casi cuadruplicándose para *S. aureus*.

Tabla R.12. Índice Terapéutico (IT) de GS y análogos serie GS en bacterias.

Péptido	*D-Phe ^{4,4'}	**Índice Terapéutico			
		<i>A. baumannii</i> S ^C	<i>A. baumannii</i> R ^C	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
GS	D-Phe	2.1 (1.0)	1.6 (1.0)	2.7 (1.0)	3.1 (1.0)
GSHpa	D-Hpa	1.5 (0.7)	1.1 (0.7)	2.0 (0.7)	2.9 (0.9)
GSNa1	D-1-Nal	0.1 (0.0)	N.D.	1.7 (0.6)	0.6 (0.2)
GSNa2	D-2-Nal	0.2 (0.1)	N.D.	1.5 (0.6)	0.9 (0.3)
GSDip	D-Dip	0.9 (0.4)	0.5 (0.3)	2.5 (0.9)	1.1 (0.4)
GSFlg	D-Flg	0.4 (0.2)	N.D.	0.8 (0.3)	0.7 (0.2)
GSTic	D-Tic	N.D.	N.D.	10.4 (3.8)	6.0 (2.0)

*D-Phe es sustituido por el aminoácido indicado. IT = HC₅₀ / CMI₅₀. **Entre paréntesis se indica el valor normalizado respecto a GS. S^C: *A. baumannii* ATCC 19606 sensible a colistina, R^C: *A. baumannii* ATCC 19606 resistente a colistina.

4.2.2.4. Actividad leishmanicida y hemolítica de GSX y análogos de la serie GSX.

4.2.2.4.1. Evaluación de la actividad leishmanicida.

La metodología fue semejante a la descrita anteriormente (4.1.2.1 y 4.2.2.1). No todos los compuestos de esta serie inhibieron la capacidad de reducción de MTT de los parásitos en el rango de concentración estudiado (0-40 μ M), los compuestos GSXU, GSXZ y GSXt2 no fueron activos a la máxima concentración ensayada sobre promastigotes y amastigotes. La figura R.29 muestra las curvas de inhibición de la reducción de MTT de los análogos activos en dicho rango de concentración.

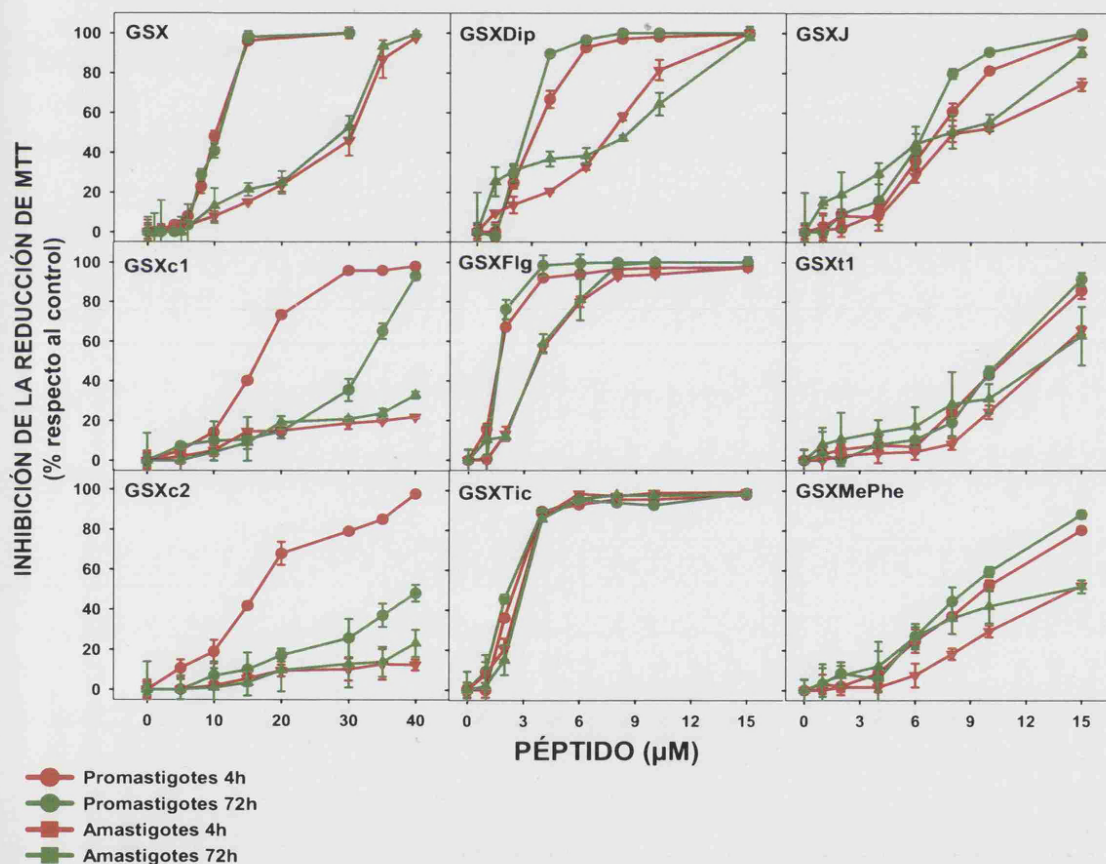


Figura R.29. Inhibición de la reducción de MTT de promastigotes de *L. donovani* y de amastigotes de *L. pifanoi* a 4h y 72h por la acción de análogos de Gramicidina S (serie GSX).

Los resultados demuestran que los daños ocasionado por los péptidos tras 4 h de incubación son irreparables, a excepción de los análogos GSXc1 y GSXc2 cuyas curvas de proliferación muestran una recuperación parcial en el caso de promastigotes. Por otro lado, estos compuestos presentan además muy baja actividad

Resultados y discusión

sobre amastigotes. La tabla R.13 recoge los valores de EC₅₀ y LC₅₀, obtenidos de las curvas de inhibición anteriores. La actividad del análogo GSX es significativamente menor que GS y dicha diferencia es mayor para la forma amastigote. Sin embargo, los análogos GSXFlg y GSXTic son más activos que GS sobre ambas formas de parásito, GSXDip sólo lo es en promastigotes mientras que es ligeramente inferior en el amastigotes. GSXJ, GSXt1 y GSXMePhe son leishmanicidas a concentraciones ligeramente superiores a GS. El resto o son inactivos (GSXU, GSXZ, GSXt2) o sufren una caída significativa en su actividad (GSXc1 y GSXc2).

Tabla R.13. Actividad leishmanicida de GS y análogos de la serie GSX.

Péptido	*Phe ^{5,5'}	**Promastigotes		**Amastigotes	
		EC ₅₀	LC ₅₀	EC ₅₀	LC ₅₀
GS	_f	4.8 (± 0.1)	4.3 (± 0.2)	5.1 (± 0.1)	4.7 (± 0.1)
GSX	Phe	10.4 (± 0.0)	12.4 (± 2.0)	27.3 (± 0.0)	25.0 (± 0.2)
GSXDip	Dip	3.1 (± 0.1)	2.7 (± 0.3)	7.4 (± 0.1)	8.5 (± 0.8)
GSXFlg	Flg	1.7 (± 0.2)	1.6 (± 0.1)	3.2 (± 0.4)	3.6 (± 0.0)
GSXTic	Tic	2.1 (± 0.1)	2.2 (± 0.1)	2.7 (± 0.0)	2.9 (± 0.1)
GSXJ	(R,R)c3diPhe	6.6 (± 0.4)	5.8 (± 0.5)	8.6 (± 1.0)	6.7 (± 2.7)
GSXU	(S,S)c3diPhe	>40.0	>40.0	>40.0	>40.0
GSXZ	Ac3c	>40.0	>40.0	>40.0	>40.0
GSXc1	(S,S)c3Phe	16.3 (± 0.0)	32.8 (± 1.8)	>40.0	>40.0
GSXc2	(R,R)c3Phe	16.0 (± 0.0)	>40.0	>40.0	>40.0
GSXt1	(S,R)c3Phe	7.8 (± 1.3)	8.6 (± 0.9)	11.4 (± 0.1)	11.7 (± 2.2)
GSXt2	(R,S)c3Phe	>40.0	>40.0	>40.0	>40.0
GSXMePhe	(αMe)Phe	8.5 (± 1.1)	8.0 (± 0.8)	10.7 (± 0.1)	9.4 (± 1.7)

*Phe^{5,5'} es sustituida por el aminoácido indicado. _f: D-Phe ocupa la posiciones 4 y 4'. EC₅₀ y LC₅₀ (μM). ** (± Desviación estándar). Promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*

4.2.2.4.2. Citotoxicidad e IT de los péptidos.

El efecto hemolítico de los análogos fue ensayado sobre eritrocitos de carnero conforme a (4.1.2.2. y 4.2.2.2). Los resultados obtenidos conjuntamente con los de GS se muestran en la figura R.30. A excepción de GSXFlg y GSXTic, todos los análogos de la serie fueron igual (GSXJ) o menos hemolíticos que GS. La disminución de citotoxicidad implica que el IT de los análogos GSX, GSXDip y GSXt1 mejora respecto al péptido parental en promastigotes, y para GSXMePhe en ambas formas del parásito. Los valores de HC₅₀ y de IT se resumen en la tabla R.14.

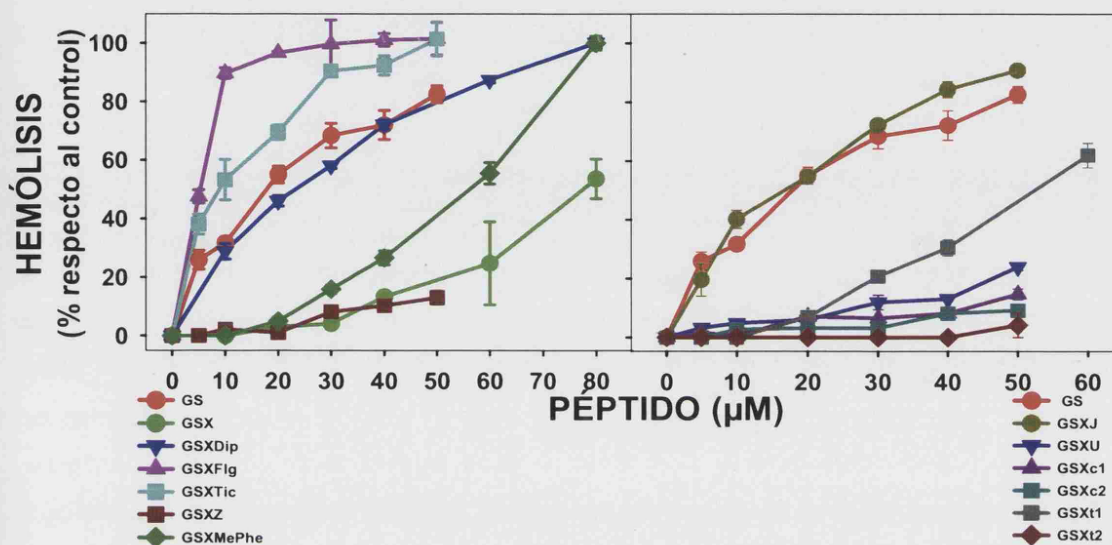


Figura R.30. Actividad hemolítica de GS y análogos de la serie GSX. El 100% de hemólisis se obtuvo con 0.1% TX-100.

Tabla R.14. Actividad hemolítica sobre eritrocitos de carnero e Índice Terapéutico para *Leishmania* de GS y análogos de la serie GSX

Péptido	*Phe ^{5,5'}	***ÍNDICE TERAPÉUTICO		**ERITROCITOS
		Promastigotes	Amastigotes	HC ₅₀
GS	_f	4.9 (1.0)	4.4 (1.0)	21.1 (± 2.6)
GSX	Phe	6.3 (1.3)	3.1 (0.7)	78.7 (± 4.2)
GSXDip	Dip	12.6 (2.6)	4.0 (0.9)	34.0 (± 3.7)
GSXFlg	Flg	1.3 (0.2)	0.6 (0.1)	2.1 (± 1.4)
GSXTic	Tic	3.5 (0.7)	2.6 (0.6)	7.7 (± 1.5)
GSXJ	(R,R)c3diPhe	4.5 (0.9)	3.9 (0.9)	26.0 (± 2.4)
GSXU	(S,S)c3diPhe	N.D.	N.D.	>50.0
GSXZ	Ac3c	N.D.	N.D.	>50.0
GSXc1	(S,S)c3Phe	N.D.	N.D.	>50.0
GSXc2	(R,R)c3Phe	N.D.	N.D.	>50.0
GSXt1	(S,R)c3Phe	6.6 (1.3)	4.9 (1.1)	57.0 (± 3.8)
GSXt2	(R,S)c3Phe	N.D.	N.D.	>50.0
GSXMePhe	(αMe)Phe	7.0 (1.4)	6.0 (1.4)	56.5 (± 3.9)

*Phe^{5,5'} es sustituida por el aminoácido indicado. _f : D-Phe ocupa la posiciones 4 y 4'. HC₅₀ (μM). ** (± Desviación estándar). Índice Terapéutico (IT). IT = HC₅₀ / LC₅₀. *** Entre paréntesis se indica el valor normalizado respecto al péptido parental. Promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*

Resultados y discusión

4.2.2.4.3. Alteraciones en la membrana plasmática de promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.

- Alteraciones morfológicas. Microscopía electrónica.

El ensayo se realizó con aquellos análogos que presentaron un IT superior al de GS como péptido de referencia. En promastigotes se apreció vacuolización del citoplasma y desorganización de orgánulos intracelulares en todos los casos estudiados, así como en amastigotes tratados con GSXDip. El resto de péptidos en amastigotes provocó formación de ampollas sobre la superficie celular del amastigote. De nuevo se aprecia una población de promastigotes que mantiene una morfología similar al control después de la incubación con los compuestos.

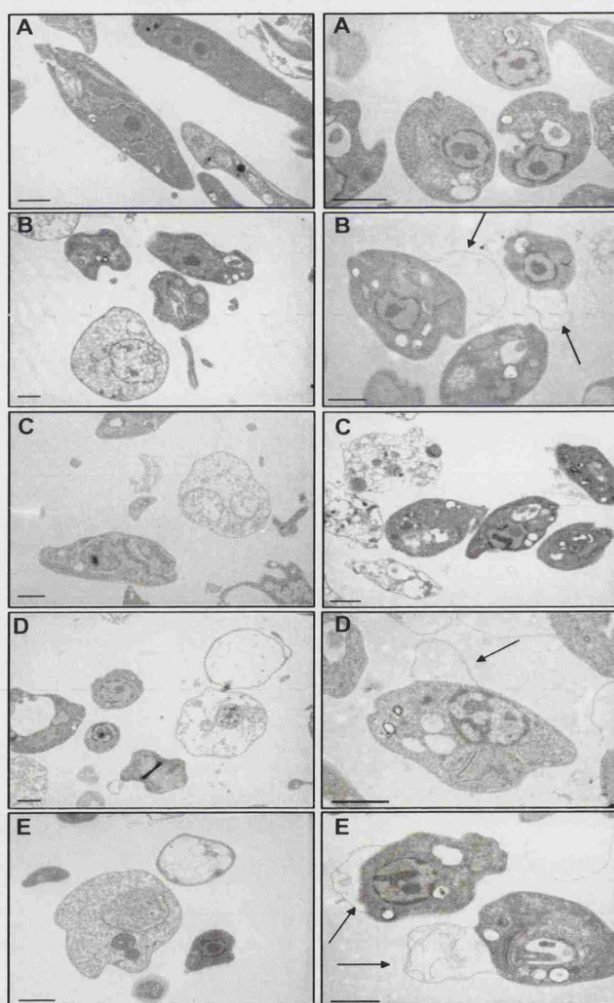


Figura R.31. Microscopía electrónica de transmisión de promastigotes de *L. donovani* (panel izquierdo) y de amastigotes de *L. pifanoi* (panel derecho) tratados con los péptidos a una concentración equipotente equivalente a su EC_{50} . Barra de aumento = 1 µm. Las flechas indican las ampollas formadas en la membrana plasmática debido a la acción del péptido. A: Control, B: GSX (10 µM), C: GSXDip (3 µM), D: GSXt1 (8 µM), E: GSXMePhe (8 µM).

• Permeabilización de la membrana plasmática de *Leishmania*.

Los estudios de permeabilización de membrana plasmática (figuras R.32 y R.33) se realizaron conforme a la metodología descrita (apartado 3.8.2.). El patrón de alteración de la membrana plasmática coincide con la interpretación de la microscopía electrónica; a concentraciones cercanas a la EC_{50} el porcentaje de fluorescencia es en general superior para promastigotes que para amastigotes, lo que demuestra las diferencias en el tipo de lesión producida.

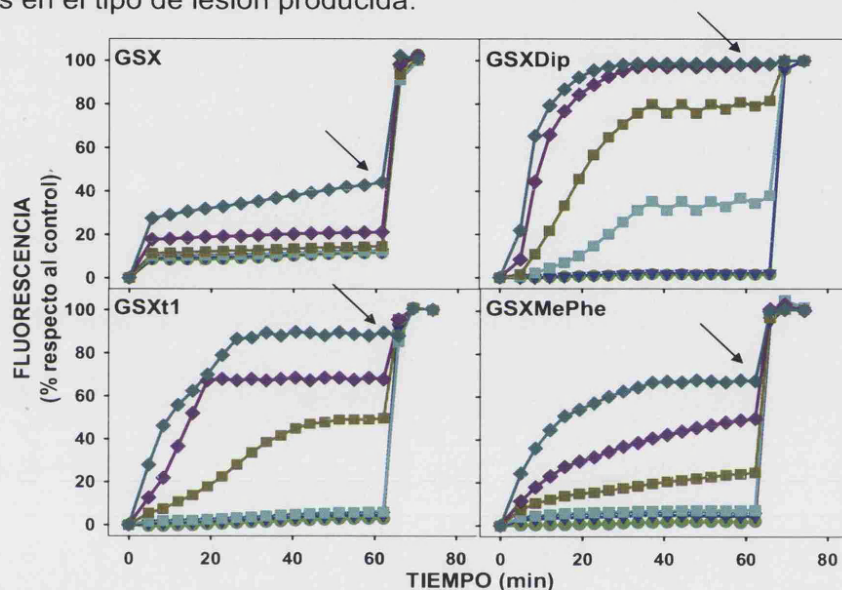


Figura R.32. Variación de la fluorescencia de SYTOX Green tras la adición de péptidos a promastigotes de *L. donovani*. Las flechas indican la adición de 0.1% de TX-100.

Concentración de péptido (μ M). —●— 2 —▼— 4 —■— 8 —■— 10 —◆— 15

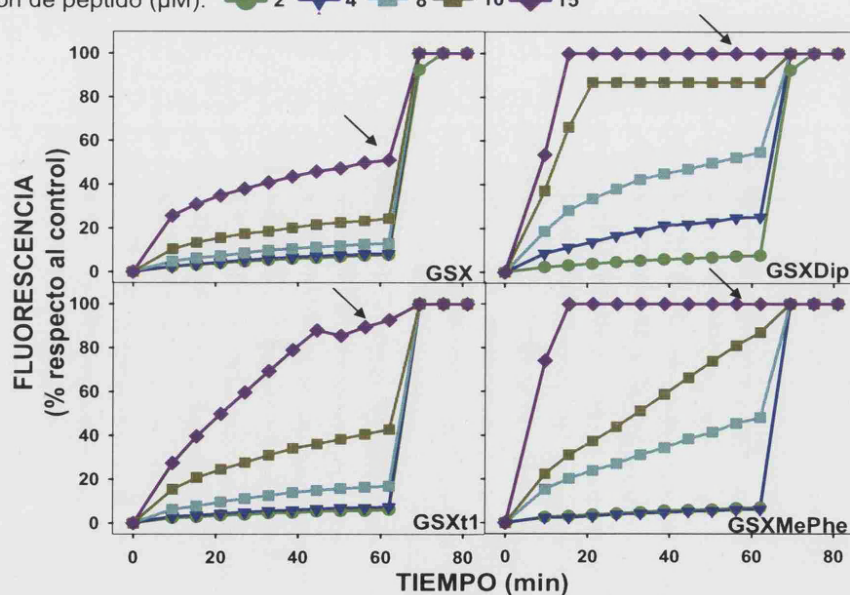


Figura R.33. Variación de la fluorescencia de SYTOX Green tras la adición de péptidos a amastigotes de *L. pifanoi*. Las flechas indican la adición de 0.1% de TX-100.

Concentración de péptido (μ M). —●— 2 —▼— 4 —■— 8 —■— 10 —◆— 15 —◆— 20

Resultados y discusión

En amastigotes, con la excepción del compuesto GSXDip, no se logró permeabilización de membrana a concentraciones inferiores a 10 μM y a 20 μM , la máxima concentración ensayada, no se alcanzó el 100% (fig. R.33).

- Despolarización de la membrana plasmática del parásito.

A continuación se estudió el efecto de los péptidos sobre la despolarización de la membrana plasmática del parásito (apartado 3.8.1.). Todos los péptidos provocaron un incremento de fluorescencia de la sonda bisoxonol dependiente de la concentración en ambas formas del parásito (figura R.34 y R.35). El incremento de fluorescencia para GSX fue inferior al resto de los estudiados, de conformidad con los datos de actividad leishmanicida para dicho análogo.

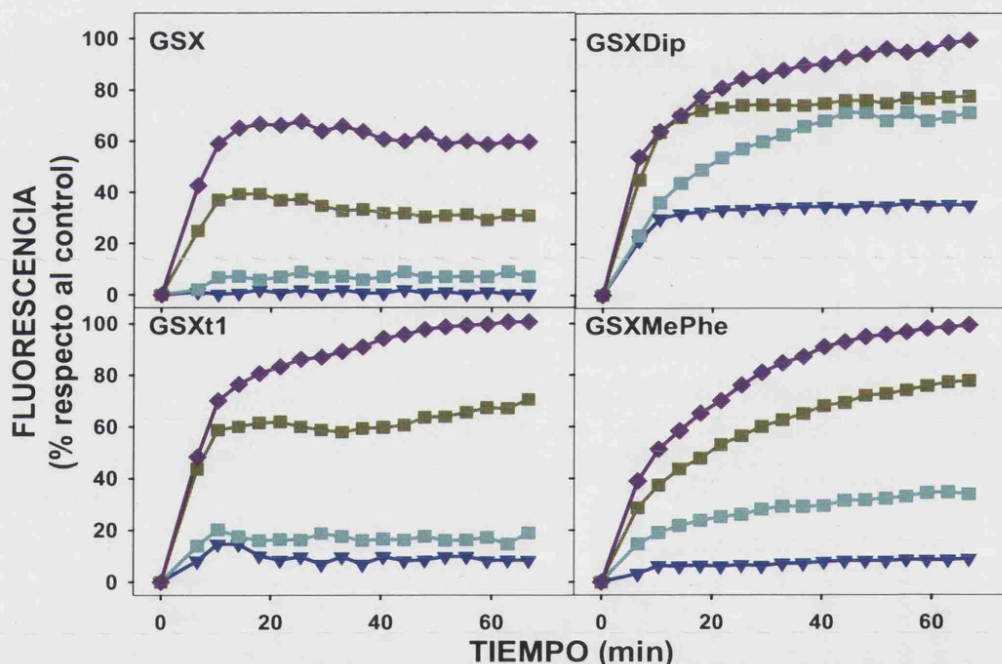


Figura R.34. Incremento de la fluorescencia de la sonda bisoxonol en promastigotes de *L. donovani* tras la adición de péptidos. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 5 μM de CA(1-8)M(1-18).

Concentración de péptido. (μM). \blacktriangledown 4 \blacksquare 8 \blacksquare 10 \blacklozenge 15

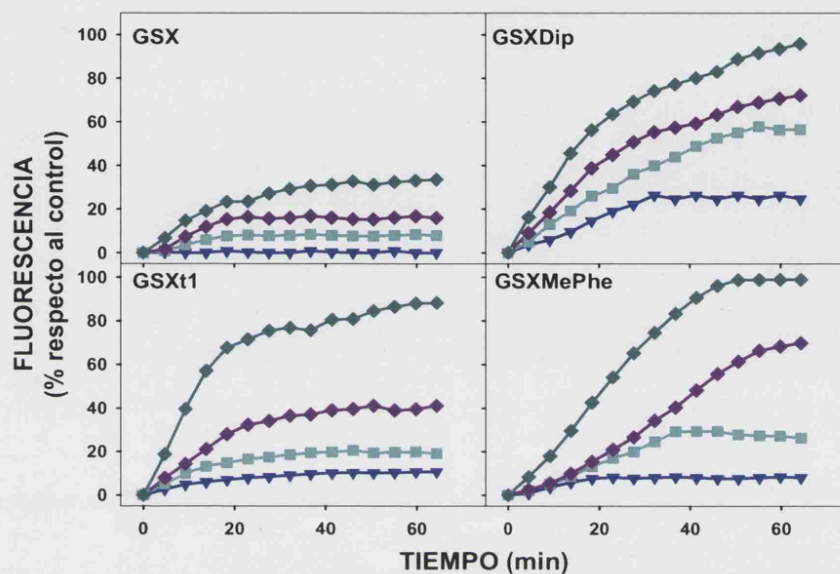


Figura R.35. Incremento de la fluorescencia de la sonda bisoxonol tras la adición de GSX y análogos en amastigotes de *L. pifanoi*. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 5 μ M de CA(1-8)M(1-18). Concentración de péptido (μ M). — 4 — 8 — 15 — 20

- Variación de los niveles de ATP intracelular.

Los análogos de GS, serie GSX, estudiados produjeron una caída de luminiscencia dependiente de su concentración de péptido, y cuya magnitud se relaciona tanto con la actividad leishmanicida del análogo ensayado (figura R.36), como con el resto de parámetros de permeabilización de membrana estudiados.

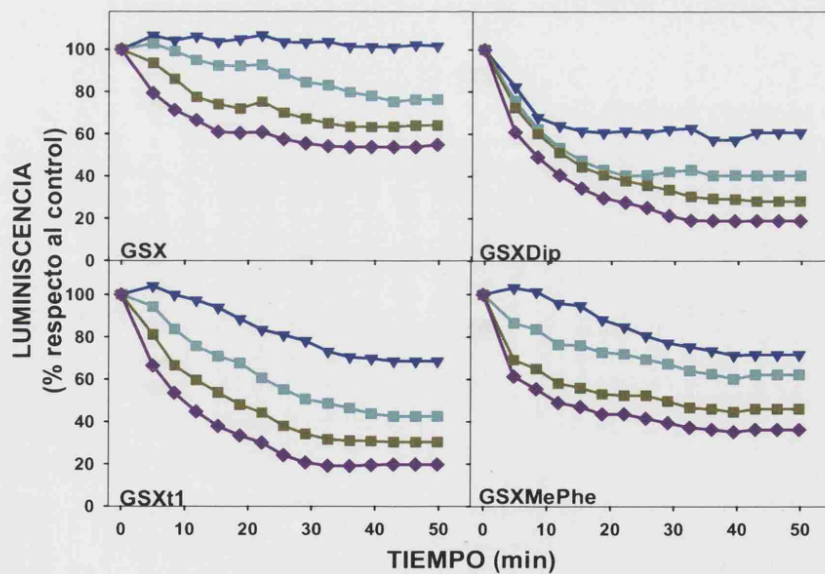


Figura R.36. Disminución de luminiscencia de promastigotes de *L. donovani* cepa 3-Luc tras la adición de análogos de Gramicidina S (serie GSX) a diferentes concentraciones. Concentración de péptido (μ M). — 4 — 8 — 10 — 15

Resultados y discusión

4.2.2.5. Actividad de Gramicidina S y análogos de la serie GSX en bacterias.

4.2.2.5.1. Inhibición del crecimiento bacteriano.

Las tablas R.15 y R.16 muestran los resultados de CMI para bacterias obtenidas mediante el método de microdilución descrito en el apartado 3.5.2. En bacterias Gram-negativas la mayoría de los compuestos resultaron inactivos a la máxima concentración ensayada (30 μ M), incluso para el análogo GSX, en el que sólo se invirtió la posición del dipéptido implicado en el giro β . Sin embargo esta actividad se recuperó parcialmente para GSXDip, y mejoró con GSXTic y GSXFlg. El comportamiento de GSXMePhe en Gram-negativas fue anómalo, con una CMI₅₀ inferior a GS, mientras que su CMI fue superior.

Tabla R.15. Actividad bactericida de GS y análogos de la serie GSX sobre Gram-negativas.

PÉPTIDO	*Phe ^{5,5'}	**A. baumannii S^C		**A. baumannii R^C	
		CMI	CMI ₅₀	CMI	CMI ₅₀
GS	_f	15.0	10.1 (\pm 0.4)	20.0	13.1 (\pm 0.0)
GSX	Phe	>30.0	24.8 (\pm 1.2)	>30.0	>30.0
GSXDip	Dip	25.0	20.3 (\pm 0.3)	>30.0	23.9 (\pm 2.1)
GSXFlg	Flg	10.0	5.0 (\pm 0.3)	20.0	14.3 (\pm 1.9)
GSXTic	Tic	10.0	5.1 (\pm 0.1)	12.0	8.5 (\pm 2.1)
GSXJ	(R,R)c3diPhe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXU	(S,S)c3diPhe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXZ	Ac3c	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXc1	(S,S)c3Phe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXc2	(R,R)c3Phe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXt1	(S,R)c3Phe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXt2	(R,S)c3Phe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXMePhe	(α Me)Phe	30.0	9.6 (\pm 0.4)	30.0	7.0 (\pm 1.4)

* Phe es sustituido por el aminoácido indicado. _f: D-Phe ocupa la posiciones 4 y 4'. CMI y CMI₅₀ (μ M)

** (\pm Desviación estándar). S^C: Sensible a colistina, R^C: Resistente a colistina. N.D: No determinado. S^C: A. baumannii ATCC 19606 sensible a colistina, R^C: A. baumannii ATCC 19606 resistente a colistina.

Resultados y discusión

En bacterias Gram-positivas la inversión D-Phe por D-Pro también supuso una notable pérdida de actividad, especialmente significativa en *L. monocytogenes* comparada con *S. aureus*. Las sustituciones posteriores con análogos de Phe provocaron recuperación de actividad (GSXMePhe), mejora significativa (GSXDip, GSXFlg, GSXTic y GSXJ) o pérdida total de la misma a la máxima concentración ensayada (30 μ M) (GSXU, GSXZ, GSXc1, GSXc2, GSXt1 y GSXt2).

Tabla R.16. Actividad bactericida de GS y análogos de la serie GSX sobre Gram-positivas.

Péptido	*Phe ^{5,5'}	** <i>S.aureus</i>		** <i>L. monocytogenes</i>	
		CMI	CMI ₅₀	CMI	CMI ₅₀
GS	_f	10.0	7.9 (\pm 0.8)	11.0	6.7 (\pm 0.2)
GSX	Phe	25.0	15.8 (\pm 0.0)	30.0	23.6 (\pm 0.0)
GSXDip	Dip	7.0	3.8 (\pm 0.8)	6.0	3.4 (\pm 0.5)
GSXFlg	Flg	4.0	2.2 (\pm 0.1)	4.0	2.2 (\pm 0.2)
GSXTic	Tic	4.0	2.4 (\pm 0.2)	4.0	2.4 (\pm 0.1)
GSXJ	(R,R)c3diPhe	6.0	3.2 (\pm 0.5)	8.0	5.1 (\pm 0.5)
GSXU	(S,S)c3diPhe	30.0	23.8 (\pm 0.4)	N.D	>30.0
GSXZ	Ac3c	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXc1	(S,S)c3Phe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXc2	(R,R)c3Phe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXt1	(S,R)c3Phe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXt2	(R,S)c3Phe	N.D	>30.0	N.D	>30.0
GSXMePhe	(α Me)Phe	15.0	11.9 (\pm 1.0)	10.0	6.8 (\pm 0.3)

* Phe es sustituido por el aminoácido indicado. _f: D-Phe ocupa la posiciones 4 y 4'. CMI y CMI₅₀ (μ M)

** (\pm Desviación estándar). N.D.: No determinado

Resultados y discusión

4.2.2.5.2. Índice Terapéutico de los péptidos en bacterias.

El IT fue calculado para los análogos activos de la serie GSX (tabla R.17), utilizando datos de HC₅₀ (apartado 4.2.2.4.2). El análogo GSX, a pesar de ser menos activo sobre bacterias que GS, mejoró su IT respectivo por su menor capacidad hemolítica. Excepto GSXFlg, todos los péptidos con actividad sobre bacterias Gram-positivas igualaron o mejoraron su IT respecto a GS. Sin embargo en bacterias Gram-negativas GSXMePhe fue el único análogo con un IT superior al de GS, en 3 y 5 veces para *A. baumannii* S^C y *A. baumannii* R^C respectivamente.

Tabla R.17. Índice Terapéutico (IT) de análogos de la serie GSX en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Péptido	*Phe ^{5,5'}	**Índice Terapéutico			
		<i>A. baumannii</i> S ^C	<i>A. baumannii</i> R ^C	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
GS	_f	2.1 (1.0)	1.6 (1.0)	2.7 (1.0)	3.1 (1.0)
GSX	Phe	3.2 (1.5)	ND	4.9 (1.8)	4.9 (1.6)
GSXDip	Dip	1.7 (0.8)	1.4 (0.9)	8.9 (3.3)	8.9 (2.9)
GSXFlg	Flg	0.4 (0.2)	0.1 (0.0)	0.9 (0.3)	0.9 (0.3)
GSXTic	Tic	1.5 (0.7)	0.9 (0.6)	3.2 (1.2)	3.2 (1.0)
GSXJ	(R,R)c3diPhe	N.D	N.D	8.1 (3.0)	5.1 (1.6)
GSXU	(S,S)c3diPhe	N.D	N.D	>2.1 (0.8)	N.D
GSXZ	Ac3c	N.D	N.D	N.D	N.D
GSXc1	(S,S)c3Phe	N.D	N.D	N.D	N.D
GSXc2	(R,R)c3Phe	N.D	N.D	N.D	N.D
GSXt1	(S,R)c3Phe	N.D	N.D	N.D	N.D
GSXt2	(R,S)c3Phe	N.D	N.D	N.D	N.D
GSXMePhe	(αMe)Phe	5.9 (2.8)	8.0 (5.0)	4.7 (1.7)	8.3 (2.7)

* Phe es sustituido por el aminoácido indicado. _f : D-Phe ocupa la posición 4.4'. IT = HC₅₀ / CMI₅₀.

**Entre paréntesis se indica el valor normalizado respecto al péptido parental. S^C: *A. baumannii* ATCC 19606 sensible a colistina, R^C: *A. baumannii* ATCC 19606 resistente a colistina. N.D.: No determinado.

4.2.3. DISCUSIÓN.

La región del giro β de la gramicidina S, como el resto de la molécula ha sido objeto de múltiples modificaciones, tanto para la optimización de sus propiedades terapéuticas, como en el establecimiento de relaciones estructura-actividad (Gibbs *et al.*, 2002; Kawai *et al.*, 2005). Las estrategias utilizadas varían desde la sustitución individual de D-Phe^{4,4'}, (Grotenbreg *et al.*, 2003; Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2006), o L-Pro^{5,5'} (Kawai *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2005) como residuos constituyentes por sus respectivos análogos, hasta la sustitución completa del giro β II por diversos peptidomiméticos, ya sean en uno o en los dos giros β existentes en la molécula (Bach *et al.*, 1991; Grotenbreg *et al.*, 2004).

En el presente estudio se planteó un estudio sistemático de la actividad biológica de dos series de análogos de GS, una primera, denominada GS, donde D-Phe es sustituido por una serie de D-aminoácidos aromáticos no proteicos y una segunda serie, GSX, con inversión de la secuencia D-Phe-Pro por D-Pro-Phe que preserve el giro β . Sobre esta última se efectuó la sustitución de L-Phe por aminoácidos aromáticos no proteicos (véase apartado 4.2.2.1). En ambos casos se preservó la estabilidad de la lámina β , el carácter catiónico de la molécula GS y aromaticidad del residuo de fenilalanina, excepto en el análogo Ac3 de la serie GSX.

Bajo las restricciones impuestas mencionadas en el párrafo anterior, las diferencias en la interacción de los diferentes análogos con la membrana plasmática de los modelos biológicos ensayados, depende esencialmente de la hidrofobicidad de la sustitución, tanto la intrínseca de la cadena lateral, es decir, directamente relacionada con el coeficiente de partición del análogo de fenilalanina, como a la "real" o práctica de la molécula, generalmente medida conforme a sus tiempos de retención en HPLC de fase reversa, donde interviene el contexto tanto secuencial como conformacional de la sustitución. La posible modificación de áreas o regiones hidrofóbicas dentro de la misma, afecta al comportamiento final de los análogos, variando su grado de agregación en solución acuosa, su inserción, especialmente en bicapas zwitteriónicas, y si ésta se realiza no como monómero sino como agregado, logrando una concentración local, al menos transitoria, muy superior a la calculada si dicho proceso fuera bajo la forma de monómero supuesta (Sal-Man *et al.*, 2002).

En la literatura de los análogos de GS existe una relación muy estrecha entre hemólisis-hidrofobicidad de la molécula (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2008; Kondejewski *et al.*, 2002). En los análogos estudiados en este trabajo sus tiempos de retención en RP-HPLC, es decir de hidrofobicidad real de la molécula, no permiten explicar su citotoxicidad. El análogo GSTic, con tiempo de retención ligeramente superior a GS

Resultados y discusión

(Solanas *et al.*, 2009) es menos hemolítico que ésta, del mismo modo los análogos GSXU y GSXMePhe con tiempos de retención semejantes a GS (Solanas *et al.*, 2010) causan en eritrocitos un daño muy inferior al péptido parental. Consecuentemente, son las variaciones conformacionales impuestas por dichas sustituciones, las principales causantes de dichas diferencias. Aparte de modificaciones más extensas, con variación del tamaño del ciclo o la quiralidad de determinados residuos, la orientación específica de las cadenas laterales de los mismos ha sido propuesta como causante de las diferencias en la actividad biológica de análogos de GS por diferentes autores (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2001; Kondejewski *et al.*, 1996b). En la fase inicial de la interacción de GS con la membrana plasmática, la orientación de la molécula es paralela al plano de la bicapa, con las cadenas apolares de Leu y Val interaccionando con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, mientras que los grupos δ -NH₂ de Orn interaccionarían con las cabezas polares de los mismos (Ashrafuzzaman *et al.*, 2008; Salgado *et al.*, 2001). Dicha forma canónica podría modificarse en ambas series de análogos tanto por el reemplazo de los residuos de Phe por sus análogos como la inversión de la secuencia del giro β en la serie GSX.

A excepción de GSTic, los resultados obtenidos para los análogos de la serie GS evidencian en todos los análogos un notable aumento de actividad en *Leishmania* y en Gram-positivos, con mejora de actividad sobre promastigotes y *S. aureus* y un ligero deterioro de la misma sobre amastigotes y *L. monocytogenes*. Sin embargo, en el modelo Gram-negativo la situación cambia drásticamente, la actividad de todos los análogos disminuye significativamente, a excepción de GSHpa, único péptido más activo que GS. El incremento de actividad de GSHpa se explicaría por la presencia del grupo metilo adicional de la cadena lateral, que aleja el anillo aromático del esqueleto peptídico, proporcionándole mayor libertad para explorar distintas orientaciones espaciales que las permitidas con D-Phe, lo que optimizaría la interacción con la membrana plasmática. Por el contrario, la menor actividad del resto de análogos en Gram-negativos radica en el incremento en el tamaño de sus grupos aromáticos, con un efecto estérico que dificultaría la interacción con LPS y, consecuentemente, su paso a través de la ME. En el caso del análogo GSTic, la principal diferencia con GS, conforme a su estructura por RMN (fig. R.37), consiste en la orientación del anillo aromático D-Tic respecto al esqueleto peptídico, siendo mucho más restringida que para GS. Esta orientación disminuye su actividad sobre bacterias Gram-negativas, y en mayor medida sobre su actividad hemolítica. GSTic es el único análogo de la serie GS con un incremento significativo del IT respecto al péptido parental, tanto en *Leishmania* como en Gram-positivos.

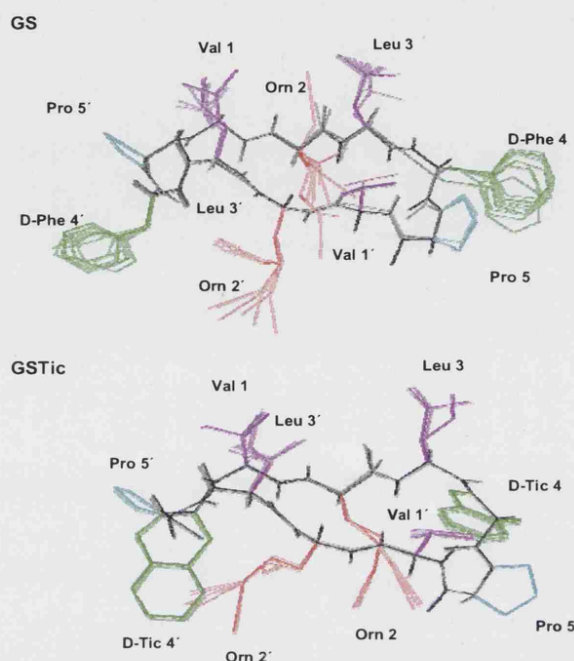


Figura R.37. Estructuras de GS (panel superior) y GSTic (panel inferior) obtenidas por RMN. Los átomos del esqueleto peptídico aparecen indicados en color negro, las cadenas laterales de D-Phe en verde, las de Pro en cian, las de Orn en rojo y las de Leu y Val en magenta. Resultados obtenidos por la Dra. M^a Ángeles Jiménez (Instituto de Estructura de la Materia, CSIC).

Los estudios de RMN demuestran que además de la rigidez del anillo aromático, de la cadena lateral de GSTic se orienta hacia el interior de la molécula (fig. R.37), situándose muy próxima al grupo $\delta\text{-NH}_2$ de Orn, con un posible incremento de la fortaleza del enlace de hidrógeno entre dicho grupo amino con el oxígeno carbonílico del residuo de D-Tic. Esta interacción ha sido observada en cristales de GS y parece mantenerse en GS en solución, aunque su estabilidad depende en gran medida del solvente (Llamas-Saiz *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2002). Una interacción similar ha sido propuesta en DMSO en un derivado de GS que contenía (Z)-(β -3-piridil)- α,β -deshidroalanina en las posiciones 4 4', uno de los análogos con mejor IT descritos hasta el momento (Yamada *et al.*, 2006). Alternativamente, la distancia entre el anillo aromático D-Tic y el grupo $\delta\text{-NH}_2$ de la Orn, cargado positivamente a pH fisiológico, podría favorecer la formación de una interacción de tipo Π -catión. En ambos casos, dicha interacción contribuiría a la estabilidad del péptido en solución acuosa con disminución de la afinidad del péptido hacia la membrana ya que $\delta\text{-NH}_3^+$ de Orn interaccionan con las cabezas polares de los fosfolípidos, lo cual supondría la desaparición de interacción entre Orn y D-Phe, independientemente si está mediada por un puente de hidrógeno como si es de tipo catión- Π , con el consiguiente coste

Resultados y discusión

energético, que sería superior en membranas zwitteriónicas que en aniónicas, compensada por la interacción electrostática establecida entre $\delta\text{-NH}_3^+$ con los fosfolípidos aniónicos. Este hecho explicaría la fuerte disminución de su actividad hemolítica contrastada con la considerablemente menor en patógenos Gram-negativos y *Leishmania*.

Respecto a la serie GSX, dado que la permutación simple D-Phe-L-Pro por L-Pro-D-Phe conlleva una pérdida completa de actividad del péptido (Tamaki *et al.*, 1985), se decidió realizar una inversión de la secuencia D-Phe-Pro por D-Pro-Phe, con el objetivo de mantener la actividad biológica. Dicha inversión supone una significativa reducción de actividad en los tres modelos estudiados, pero a su vez este cambio implica una notable disminución de la actividad hemolítica, con un aumento significativo del IT del análogo GSX respecto a GS en bacterias, y una leve mejoría del mismo en promastigotes. Sin embargo, esta menor actividad microbicida de GSX puede ser compensada ya por incorporación de análogos con un mayor número de grupos aromáticos, probablemente capaces de ocupar la posición del grupo fenilo de D-Phe^{4-4'} de GS, o bien, en los análogos con un único anillo aromático, por la adopción de una orientación adecuada del mismo. Así los análogos que incorporan Dip, Flg y Tic, no sólo recuperan sino que mejoran la actividad leishmanicida, y junto con GSXJ también lo hacen en la bactericida. Por otra parte, los análogos GSXJ, GSXt1 y GSXMePhe recuperan la actividad leishmanicida, y GSXMePhe presenta valores de actividad bactericida próximos a los de GS.

Como tendencia general la actividad hemolítica de los análogos muestra un cierto paralelismo con su actividad antimicrobiana, así los análogos más activos (GSXFlg y GSXTic) son más hemolíticos que GS, por lo que no mejoran el IT del péptido parental, mientras que los menos activos pierden su capacidad hemolítica. Las excepciones son GSDip que no sólo es más activo que GS sino que también es menos hemolítico, y por ello presenta un IT mayor que GS tanto en *Leishmania* como en el modelo Gram-positivo, y GSXMePhe, con un incremento del IT en todos los modelos estudiados, incluido *A. baumannii*. El IT de GSXMePhe es entre tres y cinco veces superior al del péptido de referencia en la cepa sensible y resistente a colistina respectivamente. Dado que la resistencia a colistina es el último recurso contra esta bacteria, estas cepas constituyen un serio problema en clínica (Peleg *et al.*, 2008), por lo que creemos que GSXMePhe es de interés para un posible futuro desarrollo clínico en esta serie. En esta ocasión los resultados de RMN obtenidos (fig. R.38) no aportan una clave de fácil interpretación para explicar tal comportamiento.

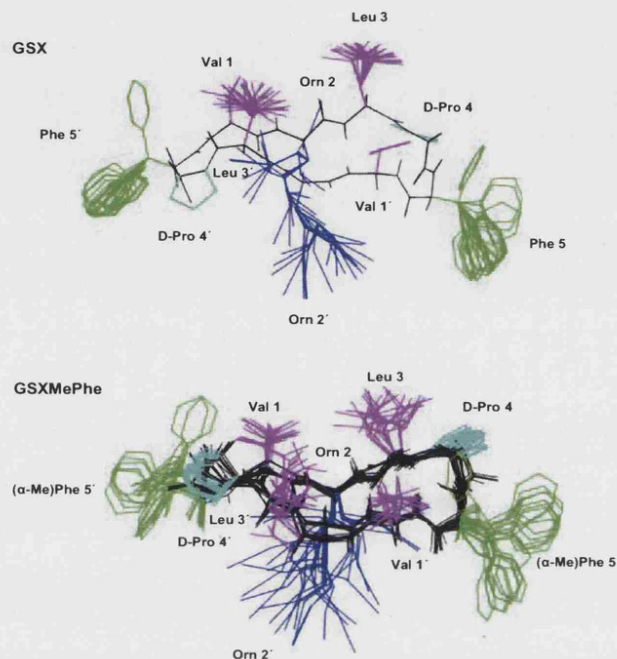


Figura R.38. Estructuras de GSX (panel superior) y GSMePhe (panel inferior) obtenidas por RMN. Los átomos del esqueleto peptídico aparecen indicados en color negro las cadenas laterales de D-Phe en verde, las de Pro en cian, las de Orn en azul y las de Leu y Val en magenta Resultados obtenidos por la Dra. M^a Ángeles Jiménez (Instituto de Estructura de la Materia, CSIC).

A pesar de la ausencia de una descripción precisa del mecanismo letal de GS, éste se asocia indefectiblemente a su capacidad de permeabilización de membranas biológicas de los organismos diana, al igual que la mayoría de los PAs (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2008; Prenner *et al.*, 2005). Los análogos en ambas series siguen un patrón muy semejante. En microscopía electrónica (figs. R.25 y R.31) se observa que *Leishmania* tras 4h de incubación con los péptidos muestra el típico patrón de pérdida de material intracelular consecuente a la permeabilización de ésta, siendo más acusado en promastigote que en amastigotes. En estos últimos se aprecia formación de ampollas (*blebbings*) en la membrana plasmática, aunque con menor daño a orgánulos citoplásmicos y menor pérdida del material celular que la observada en promastigotes. En relación a la gravedad de la lesión causada por los péptidos en los parásitos se observa repetidamente la aparición de dos poblaciones celulares, una con daños estructurales muy considerables mientras que la otra, mantiene una morfología inalterada tras las 4 h de incubación, típico de un efecto “todo o nada” de actuación del péptido, ya descrito en otros péptidos con actividad leishmanicida (Guerrero *et al.*, 2004) y en el punto anterior para los péptidos trimetilados. Es interesante denotar que

Resultados y discusión

las curvas de actividad respecto a la concentración del péptido a 4 h y de inhibición de la proliferación son prácticamente solapantes, lo que implica una irreversibilidad del daño, a pesar de que la morfología del parásito y el del contenido intracelular aparezcan esencialmente intactos. En los ensayos de permeabilización de membrana se observa que todos los péptidos provocan una rápida despolarización de membrana plasmática dependiente de la concentración de péptido, mientras que la permeabilización a la sonda SYTOX Green es más lenta y en algunos casos, como GSTic, concentraciones letales no alcanzan el 100% de permeabilización. Aparentemente la despolarización de membrana sería condición suficiente para garantizar la muerte del organismo, que podría explicarse más que por una formación de poros de estequiometría definida como sucede con ciertos PAs α -helicoidales (Chan *et al.*, 2006), a perturbaciones en la estructura de la membrana suficientes para despolarizar el organismo, ya descritas para GS en diferentes tipos de membranas modelo (Ashrafuzzaman *et al.*, 2008), y que con el tiempo puedan ya madurar a lesiones más considerables o desencadenar un proceso lítico en el organismo. Dichos resultados son concordantes con una disminución de luminiscencia en la cepa 3-Luc, es decir de los niveles de ATP, más paulatina y suave que el brusco descenso con otros péptidos antibióticos (Berrocal-Lobo *et al.*, 2009; Luque-Ortega *et al.*, 2001).

Como resumen del presente capítulo se ha demostrado que la actividad biológica de un péptido cíclico como es GS, con fuerte restricción conformacional, es modulada significativamente incluso con modificaciones en apariencia mucho más sutiles que las sufridas por un cambio en el tamaño del ciclo o la diastereomerización de la molécula (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2000). En determinados casos, la mejora del IT es de cinco veces respecto al péptido parental, manteniendo en todos los casos dos de sus características esenciales, su carga positiva y una hoja β estable. En un futuro, los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden combinarse con una o varias modificaciones ya descritas que afecten otras zonas de la molécula, para, finalmente mejorar el IT de la gramicidina para su administración entérica. Por otro lado, los análogos seleccionados en ambas series se probarán sobre modelos de leishmaniasis cutánea murina, como posible terapia en una forma de dicha enfermedad muy escasa de alternativas quimioterapéuticas

4.3. ACTIVIDAD DE PÉPTIDOS LINEALES CECROPINA A-MELITINA Y CATELICIDINA HUMANA LL-37 SOBRE CEPAS DE *S. aureus* DE COMUNIDAD.

4.3.1. INTRODUCCIÓN.

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos humanos y responsable principal de infecciones adquiridas tanto en ambiente hospitalario como comunitario. La diseminación observada en los últimos años de cepas de *S. aureus* hipervirulentas resistentes a meticilina en la comunidad ha suscitado una alarma clínica considerable (Skov y Jensen, 2009), especialmente tras la aparición de cepas resistentes a vancomicina (Shorr, 2007; Tenover y McDonald, 2005), antibiótico de elección frente a estas cepas SARM. Nuevamente, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra las infecciones estafilocócicas es acuciante. La exposición de células del sistema inmune del hospedador a *S. aureus* induce la expresión de péptidos antimicrobianos como la β -defensina-2 y 3 (h β D2, h β D3) y LL-37, tanto *in vivo* como *in vitro* (Dinulos *et al.*, 2003). Su acción sobre diferentes cepas de *S. aureus* ha sido estudiada tanto en monoterapia como en sinergia con otros antibióticos, tales como la combinación de LL-37 y h β D3 con meticilina sobre aislados SARM (Midorikawa *et al.*, 2003). También se han ensayado fragmentos de LL-37 con mayor actividad sobre *S. aureus* que el péptido parental (Nagaoka *et al.*, 2005). Otros PAEs ensayados sobre dicha bacteria han sido imcroporina, un péptido antibiótico de escorpión, eficaz tanto *in vitro* como *in vivo* (Zhao *et al.*, 2009), omiganam, un análogo de la indolicidina, ensayado sobre cepas SARM, VISA y VRSA *in vitro* (Melo y Castanho, 2007), así como el péptido híbrido cecropina A-melitina CA(1-7)M(2-9) activo *in vitro* sobre cepas clínicas SARM y que además es sinérgico con imipenem y amoxicilina-clavulánico (Giacometti *et al.*, 2004).

La expansión de infecciones comunitarias por cepas SARM con mayor virulencia que las nosocomiales, se ha asociado a la toxina LPV, una exotoxina formadora de poros en la célula que origina necrosis en la piel y las mucosas incluyendo la neumonía hemorragia necrótica, que puede ser mortal en tan sólo 72 h. LPV está formada por dos subunidades, LukS-PV y LukF-PV, con masas respectivas muy similares, de 33 y 34 Kda, y especialmente activas en linfocitos y células de linaje macrófago. LPV se encuentra en el 77% de los aislados CO-SARM (Naimi *et al.*, 2003). Actualmente, la visión sobre el papel de la citada toxina es controvertida; publicaciones recientes la hacen responsable de la neumonía necrotizante (Diep *et al.*, 2010; Vardakas *et al.*, 2009), sin embargo, la gravedad de infecciones en aislados isogénicos de SARM carentes de PVL no es vinculante a infecciones de piel, tejido

Resultados y discusión

blando y bacteriemia causadas por CO-SARM (Voyich *et al.*, 2006). Las opiniones actuales sugieren la intervención de mutaciones de *agr*, un regulador maestro de la virulencia de *S. aureus* (Diep y Otto, 2008), o de la expresión ya de la α -toxina, o de los denominados péptidos de modulina solubles en fenol (Li *et al.*, 2009). Estos péptidos secretados por *S. aureus* han sido clasificados en dos tipos: los α y β , inferiores o superiores a 20 aminoácidos respectivamente, y cuya expresión es más elevada en los aislados de *S. aureus* de comunidad. La delección de los α -péptidos disminuye considerablemente la mortalidad en modelos animales, mientras que la de los β sólo logra una leve disminución (Wang *et al.*, 2007). Dichos péptidos activan, y finalmente lisan los neutrófilos; sus genes se encuentran en todos los aislados de *S. aureus*, y su expresión está gobernada por factores independientes de *agr*. Poseen unas características muy similares a PAs, compartiendo con ellos anfipaticidad y cationicidad. Los aislados de CO-SARM, que producen elevados niveles de dichos péptidos líticos sobre la membrana, no autoeliminan a la célula productora, por lo que se supondría una cierta resistencia de los mismos a los PAEs, tales como LL-37, al ser *S. aureus* un componente de la microflora de la piel en contacto permanente con dicho péptido, o de las α -defensinas, liberadas por la lisis de los neutrófilos por los citados péptidos. Una incógnita derivada es si dicha resistencia existiera, si podría ser superada con nuevos péptidos de diseño para conseguir una terapia al menos cutánea de las infecciones por CO-SARM.

Se han ensayado una serie de PAEs, de la familia de los péptidos híbridos cecropina A-melitina y LL-37 sobre 12 cepas de *S. aureus* aisladas de comunidad e identificadas mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE), con diferentes patrones de resistencia a vancomicina y meticilina, así como de expresión de LPV. Incluyendo la cepa USA 300 resistente a meticilina, responsable mayoritaria de las infecciones estafilocócicas comunitarias en EEUU (Kobayashi y DeLeo, 2009), y las cepas MU 50 y MU 3 como ejemplo de cepas que presentan resistencia homogénea y heteroresistencia a vancomicina respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

4.3.2. RESULTADOS

4.3.2.1. Péptidos utilizados en el estudio.

La tabla R.18 muestra la secuencia y masas moleculares de los péptidos utilizados en este apartado. Todos fueron sintetizados por el grupo del Prof. D. Andreu (Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona) mediante síntesis en fase sólida según protocolos estándar de química Fmoc, purificados por cromatografía de fase reversa HPLC, y caracterizados por espectrometría de masas MALDI-TOFF. Los péptidos ensayados fueron 3 híbridos péptidos cecropina A-melitina y LL-37, la única catelicidina humana presente en numerosas localizaciones anatómicas, incluyendo la piel. Todos los péptidos presentaron una pureza superior al 95% y se encuentran amidados en su extremo C-terminal.

Tabla R.18. Secuencias y masas moleculares de péptido híbridos cecropina A-melitina y LL-37.

Péptido	Secuencia	* Masa molecular
CA(-1-8)M(1-18)	KWKLFKKIGIGAVLKVLTTGLPALIS-NH ₂	2794
CA(-1-7)M(2-9)	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	1770
CA(-1-7)M(5-9)	KWKLFKKVLKVL-NH ₂	1529
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-NH ₂	4500

* Masa molecular calculada por MALDI-TOFF.

4.3.2.2. Actividad de péptidos Cecropina A-melitina y LL-37 sobre *S. aureus* aislados de comunidad

4.3.2.2.1. Evaluación de la viabilidad bacteriana y obtención de la CMI.

Las cepas de *S. aureus* estudiadas fueron una cepa perteneciente a la CECT y 12 cepas aisladas de comunidad, siete de las cuales expresan la toxina Leucocidina Pantón-Valentine (LPV+). El método empleado para la determinación de la CMI se ha descrito en el apartado 3.5.2. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla R.18. Aunque todos los péptidos híbridos cecropina A-melitina fueron activos en el rango micromolar, en todas las cepas existe una menor susceptibilidad a los mismos para las aisladas de comunidad respecto a la CECT, pero no se observó diferencia entre las cepas LPV+ ó LPV-. El péptido LL-37 fue el menos activo de los estudiados, ya que incluso a la concentración más alta ensayada (60µM) no alcanza la CMI, siendo éste

Resultados y discusión

también más activo sobre la cepa de la CECT.

Para comprobar si las diferencias en la susceptibilidad obedecían a la variación en la producción de peptidasas, se comparó la actividad del péptido CA(1-7)M(2-9) y su forma enantiómera todo-D, los resultados se recogen en la tabla R.20. En los tres casos el péptido todo D fue más activo que el péptido parental, tanto en la cepa CECT como en las otras dos.

Tabla R.20. Actividad de CA(1-7)M(2-9) y su D enantiómero sobre *S. aureus*

<i>S. aureus</i>	*CA(1-7)M(2-9)		*D-CA(1-7)M(2-9)	
	CMI	CMI₅₀	CMI	CMI₅₀
CECT 240	9.0	6.0 (± 1.1)	8.0	2.4 (± 0.1)
N8 LPV+	16.0	10.1 (± 0.6)	10.0	7.5 (± 1.0)
N10 LPV-	16.0	10.0 (± 1.0)	10.0	4.2 (± 0.7)

CMI y CMI₅₀. (μM) *(± Desviación estándar).

Tabla R.19. Actividad de híbridos Cecropina A-melitina y LL-37 sobre *S. aureus* CECT240 y cepas aisladas de comunidad.

Cepa	*CA(1-8)M(1-18)			*CA(1-7)M(2-9)			*CA(1-7)M(5-9)			*LL-37	
	CMI (μM)	CMI ₅₀ (μM)		CMI (μM)	CMI ₅₀ (μM)		CMI (μM)	CMI ₅₀ (μM)		CMI (μM)	CMI ₅₀ (μM)
CECT 240	10.0	6.7 (± 1.4)		8.0	4.4 (± 0.1)		12.0	6.9 (± 2.4)		30.0 (± 5.0)	19.0 (± 4.0)
N8 ^(LPV+) SARM	20.0	12.6 (± 3.1)		16.0	9.1 (± 4.3)		16.0	8.8 (± 3.1)		>60.0	33.9 (± 1.7)
N10 ^(LPV-) SARM	20.0	12.4 (± 1.1)		16.0	8.9 (± 2.3)		16.0	8.5 (± 5.3)		>60.0	44.1 (± 2.2)
N11 ^(LPV-) SARM	18.0	10.1 (± 1.9)		16.0	7.1 (± 2.5)		18.0	11.4 (± 1.3)		>60.0	49.6 (± 4.6)
N152 ^(LPV+) SARM	20.0	9.8 (± 1.3)		16.0	9.3 (± 1.2)		16.0	8.1 (± 0.3)		>60.0	52.7 (± 4.6)
A1 USA 300 ^(LPV+) SARM	15.0	7.9 (± 1.5)		10.0	5.3 (± 0.2)		20.0	8.2 (± 0.4)		>60.0	40.8 (± 12.2)
A2 ^(LPV+) SARM	20.0	17.1 (± 7.3)		8.0	4.8 (± 1.0)		15.0	7.9 (± 0.4)		N.D	>60.0
A3 ^(LPV+) SARM	20.0	15.0 (± 2.9)		8.0	5.1 (± 1.0)		15.0	7.6 (± 0.2)		N.D	>60.0
A4 ^(LPV+) SARM	20.0	8.6 (± 2.8)		8.0	4.0 (± 0.6)		15.0	7.8 (± 1.5)		>60.0	49.6 (± 5.4)
A5 6250 ^(LPV+) SARM	15.0	8.8 (± 0.2)		15.0	10.0 (± 1.0)		>20.0	21.0 (± 4.0)		N.D	>60.0
A5 1278 ^(LPV-) SARM	15.0	8.1 (± 1.5)		10.0	5.9 (± 1.1)		20.0	12.0 (± 2.9)		N.D	>60.0
MU 3 ^(LPV-) VISA	15.0	10.7 (± 3.0)		10.0	6.2 (± 1.0)		20.0	14.4 (± 15)		>60.0	48.6 (± 12.8)
MU 50 ^(LPV-) VISA	15.0	7.4 (± 2.4)		8.0	4.9 (± 2.3)		10.0	7.8 (± 1.0)		N.D	>60.0

*(± Desviación estándar). N.D: No determinado.

4.3.2.2.2. Alteraciones en la membrana citoplásmica de *S. aureus*.

- Alteraciones morfológicas. Microscopía electrónica.

Con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de los péptidos sobre *S. aureus* se observó las alteraciones morfológicas tras 4 h de incubación con los mismos mediante microscopía electrónica. Con el fin de realzar las posibles diferencias cualitativas y cuantitativas de su mecanismo de acción, todos los péptidos fueron ensayados a sus respectivas CMI₅₀. En todos los casos (fig. R.39) *S. aureus* aparece con una alteración muy notable de su membrana citoplásmica, con abundante pérdida del material citoplásmico y grave alteración de la morfología celular.

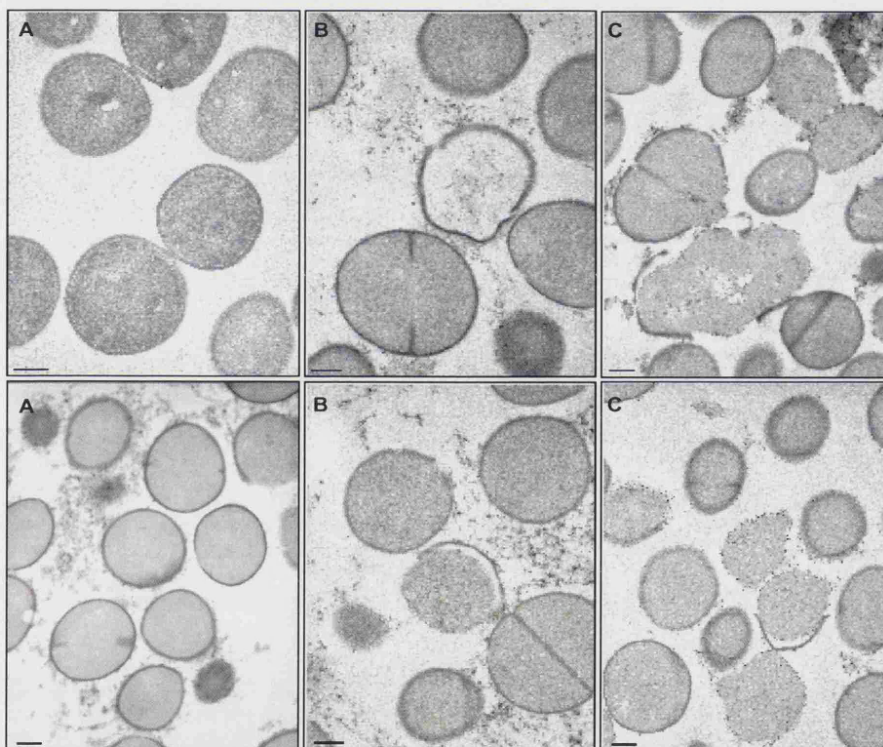


Figura R.39. Microscopía electrónica de transmisión de *S. aureus* cepas CECT (panel superior) y N° 152 (panel inferior). A: Control, B: CA(1-7)M(2-9) (4 y 9 μ M CECT y N° 152, respectivamente) y C: LL-37 (20 y 50 μ M CECT y N° 152, respectivamente), ensayados a sus respectivas CMI₅₀s. Barra de aumento = 1 μ m.

Resultados y discusión

- Permeabilización de la membrana citoplásmica.

a) Péptidos híbridos Cecropina A- melitina.

Conforme a los numerosos datos aparecidos anteriormente en la literatura, los péptidos híbridos cecropina A-melitina actúan esencialmente mediante la permeabilización de la membrana celular. Con el fin de corroborar dicho mecanismo, inicialmente confirmado por los datos de ME, se procedió a estudiar la inducción de la entrada de SYTOX-Green, como sonda vital en dichas células. Los resultados (fig. R.40) demuestran un incremento de fluorescencia respecto a la concentración de los péptidos, pero en ningún caso alcanzan el 100% conseguido mediante la lisis celular mediada por lisostafina, utilizada como control de lisis total.

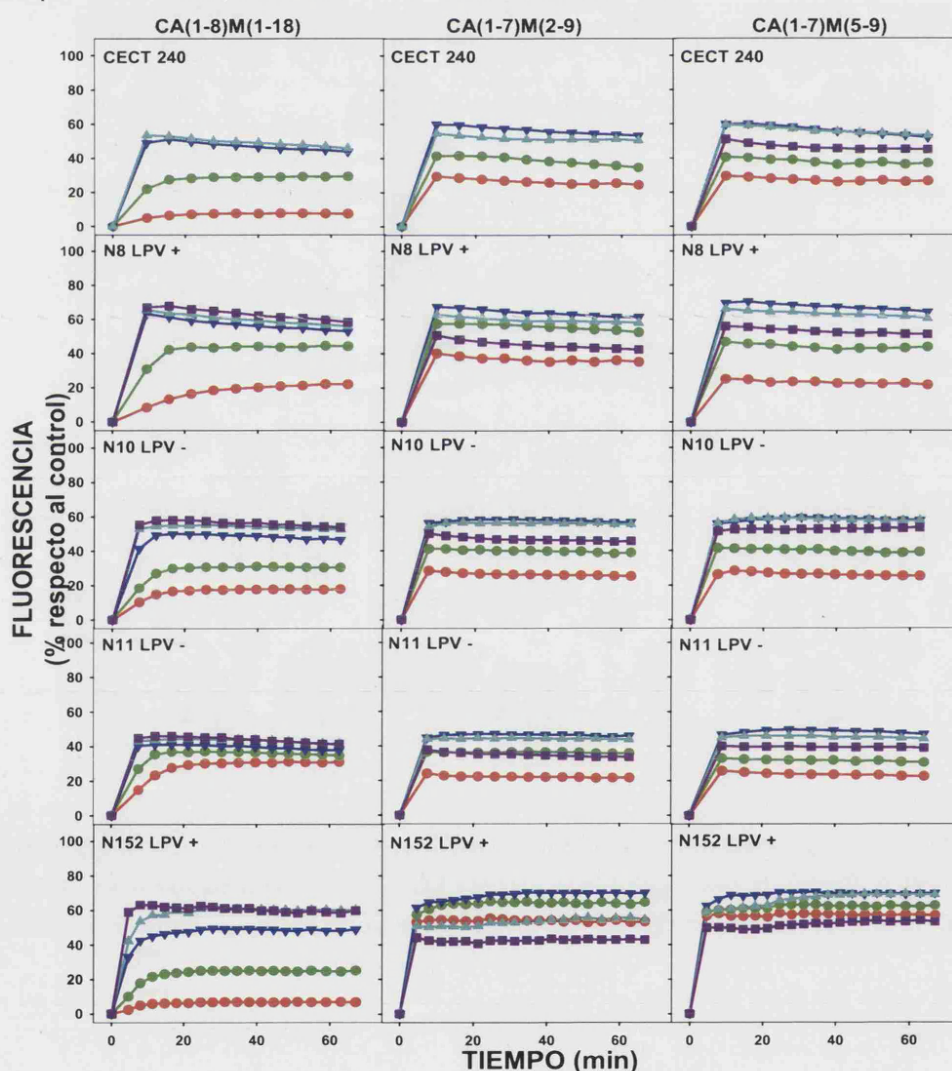


Figura R.40. Variación de fluorescencia de la sonda SYTOX Green en *S. aureus* tras la adición de híbridos cecropina A-melitina. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 0.07 µg/mL de lisostafina. Concentración de péptido(µM). ● 1 ● 2 ▼ 4 ▲ 8 ■ 15

Resultados y discusión

La explicación más pausable de este resultado sería la competición de los péptidos antibióticos policatiónicos por la unión a los ácidos nucleicos intracelulares con la sonda catiónica SYTOX Green. En dicha unión los péptidos juegan con un factor crítico de cooperatividad positiva al disponer de más de una carga positiva en su cadena. La demostración de dicho artefacto se realizó sobre células permeabilizadas con lisostafina en presencia de la sonda vital, es decir con saturación de la unión de la sonda al ADN, y a continuación se adicionó el péptido CA(1-7)M(2-9) a una concentración de 16 μM , acusando una bajada en los niveles de fluorescencia. Paralelamente, se ensayó el incremento de fluorescencia de la citada sonda tras adición inicial del péptido a una concentración de 2 μM , que causa un incremento inicial de la fluorescencia, y seguida de adiciones sucesivas y graduales de péptido que causan disminuciones aditivas de la fluorescencia (fig. R.41).

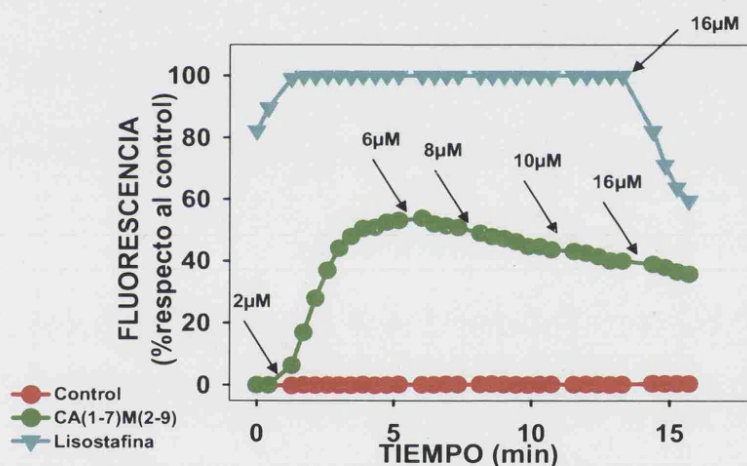


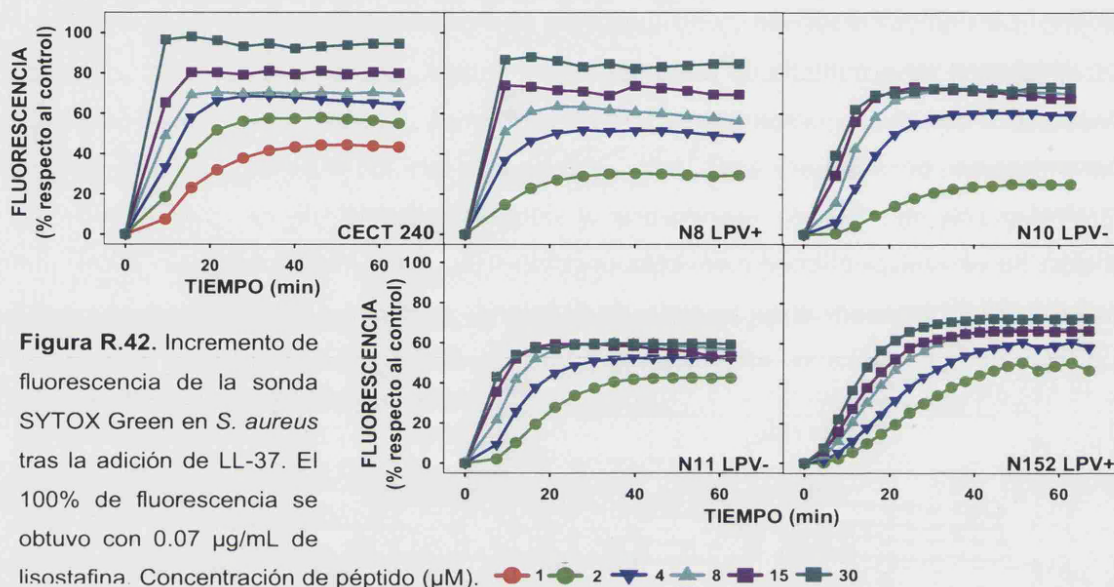
Figura R.41. Efecto de adición de 16 μM de CA(1-7)M(2-9) sobre bacterias permeabilizadas con lisostafina e incubadas con la sonda SYTOX Green, así como de la variación de la fluorescencia cuando el péptido se añade gradualmente. Las flechas indican el momento de adición de péptido y la concentración añadida.

Los resultados demuestran que la sonda unida al ADN de la bacteria es desplazada por el péptido por su mayor afinidad. En resumen, una vez descartado el artefacto de competición por el ADN, se puede afirmar que el mecanismo de acción de los péptidos consiste en la permeabilización de la membrana plasmática.

Resultados y discusión

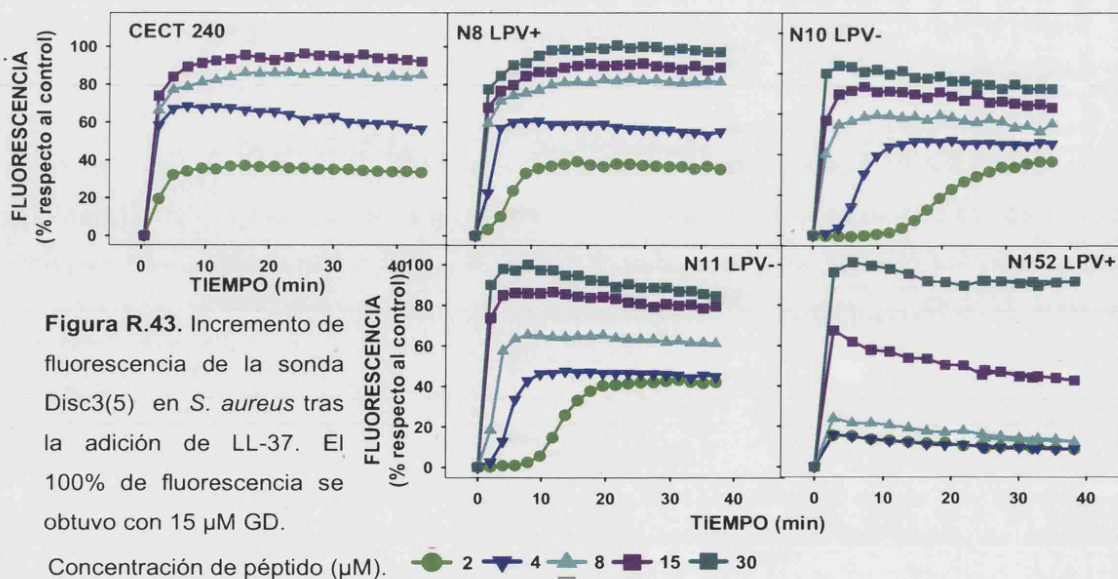
b) LL-37 catelicidina humana.

El péptido LL-37 provocó incremento de la fluorescencia dependiente de la concentración (fig R.42) siendo mayor en la cepa CECT que en las cepas aisladas de comunidad, de conformidad con los resultados previos de actividad microbica.



• Despolarización de la membrana citoplásmica.

El estudio de la variación de potencial de membrana interna de bacterias se realizó con la sonda Disc₃(5), (apartado 3.8.1). Tras la adición de los péptidos se produjo un incremento de fluorescencia dependiente de concentración en todos los casos estudiados. Los resultados obtenidos se muestran en las figura R.43 y R.44 para LL-37 e híbridos cecropina A-melitina y respectivamente.



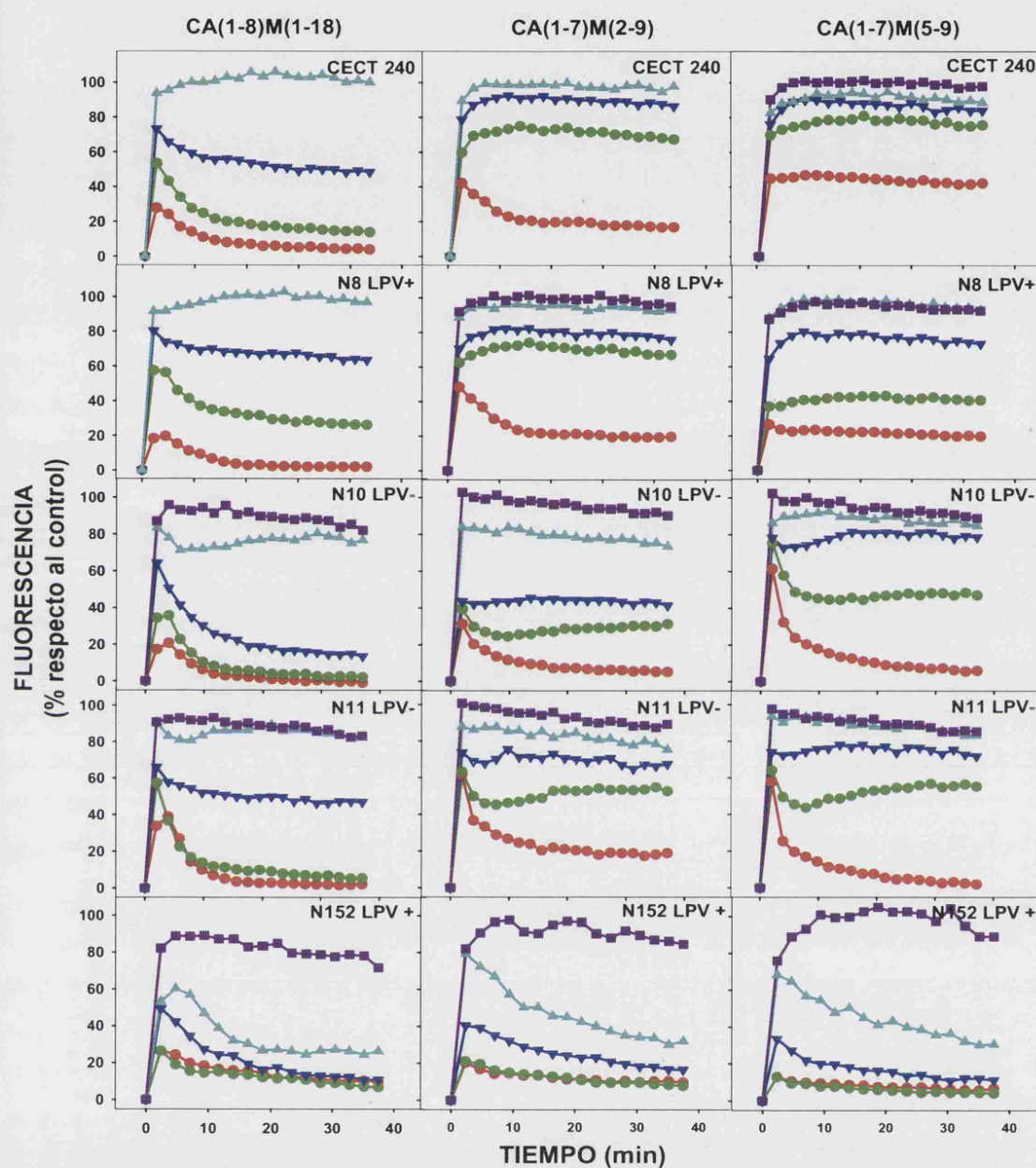


Figura R.44. Incremento de la fluorescencia de la sonda Disc3(5) en *S. aureus* tras la adición de híbridos cecropina A-melitina. El 100% de fluorescencia se obtuvo con 15 μ M de Gramicidina D. Concentración de péptido (μ M). —●— 1 —●— 2 —●— 4 —●— 8 —■— 15

Resultados y discusión

4.3.3. DISCUSIÓN.

La catelicidina humana LL-37 es uno de los pocos péptidos humanos con potente actividad antiestafilocócica, contribuye a la protección de la piel y de superficies mucosas frente a la colonización por *S. aureus* y otras bacterias Gram- positivas (Travis *et al.*, 2000), una expresión deficiente de LL-37 como sucede en la dermatitis atópica predispone a la infección por *S. aureus* (Ong *et al.*, 2002) y su actividad frente a dicho patógeno ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro* (Durr *et al.*, 2006). Sin embargo, las concentraciones requeridas para obtener actividad *in vitro* son superiores a las necesarias *in vivo*, lo que confirmaría que el control de la infecciones debida, al menos en parte, a su capacidad inmunomoduladora (Bowdish *et al.*, 2005). Por otro lado *S. aureus* ha evolucionado y desarrollado mecanismos que le confieren resistencia a los componentes de la inmunidad innata (Kraus *et al.*, 2008; Peschel *et al.*, 2001).

Los resultados presentados en este capítulo muestran la escasa susceptibilidad de todas las cepas de *S. aureus* aisladas de comunidad frente a LL-37, que requiere una concentración muy superior a la de otros péptidos para inhibir el crecimiento bacteriano, ya constatado anteriormente para otras cepas de *S. aureus* (Ouhara *et al.*, 2008). Dicha resistencia se ha asociado con la expresión de peptidasas, como la aureolisina y la proteasa V8, capaces de degradar LL-37. La aureolisina es una metaloproteasa cuya especificidad de corte es entre Arg-Leu y Leu-Val, por tanto LL-37 presentaría 3 sitios potenciales de proteólisis en las posiciones 19-20, 23-24 y 31-32, que cursa con inactivación completa del péptido. La proteasa V8 es una glutamylendopeptidasa, siendo el glutámico su potencial diana de proteólisis, y que escindiría a LL-37 entre las posiciones 6-7, 11-12 y 16-17, sin embargo, contrariamente a la aureolisina, los fragmentos resultantes son más microbicidas que el péptido inicial, ya que la actividad de LL-37 se localiza en la región C-terminal (Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004). Por proteómica de los sobrenadantes de cultivos de cepas CO-SARM, incluyendo la cepa USA 300, se ha identificado la presencia de aureolisina en los mismos (Burlak *et al.*, 2007). Determinadas condiciones medioambientales regulan su nivel de transcripción a través de un sistema regulador de dos componentes *agr* y por la familia de proteínas de unión a ADN SarA (Kubica *et al.*, 2008).

Puesto que la catelicidina LL-37 es relativamente inactiva, se procedió a ensayar los péptidos híbridos de diseño de cecropina A-melitina, basándose en la actividad descrita de CA(1-7)M(2-9) sobre cepas clínicas H-SARM (Giacometti *et al.*, 2004). Las actividades de dichos péptidos son considerablemente superiores a las de LL-37, la

Resultados y discusión

diferencia entre las cepa de referencia y las cepas CO-SARM es significativamente menor que la existente con LL-37. Los sitios teóricos de corte tanto para aureolisina como V8 están ausentes, y la posibilidad de que puedan existir otras endo-y exopeptidasas presentes en las cepas CO-SARM y ausentes en la CECT fue eliminada con el ensayo realizado con el enantiómero todo D de CA(1-7)M(2-9) (tabla R.20), cuya actividad fue sólo ligeramente superior al L- en ambas cepas, sin apreciarse diferencias significativas. Otros mecanismos subyacentes a la resistencia de *S. aureus* frente a péptidos antibióticos, consiste en la disminución del carácter aniónico del peptidoglicano y la membrana celular por : i) la inversión de la carga de los fosfolípidos de membrana, mediante la conjugación de PG a lisina (Roy y Ibba, 2008), transformando fosfolípidos aniónicos en catiónicos con la consiguiente repulsión de los péptidos antibióticos catiónicos; en dicho proceso , catalizado por la enzima codificada por el gen *mprF*, actúa como donador de lisina lisil-tRNA (Ouhara *et al.*, 2008). ii) La adición de D-Ala al ácido teicoico, gobernado por el operón *dlt*, que a su vez depende del sistema de dos componentes *graRS* (Kraus *et al.*, 2008). iii) Finalmente, otro mecanismo por el cual *S. aureus* adquiere resistencia a PAs, sin reducción de la carga negativa en la membrana, es por el transportador VraFG, cuyos mutantes *vraFG*- son más susceptibles a h β D3, nisina, indolicidina y LL-37, mientras que la susceptibilidad al péptido aniónico dermicidina no varió respecto a la cepa silvestre (Li *et al.*, 2007b).

Conforme las bacterias Gram negativas poseen el sensor de péptidos PhoP-PhoQ Li y cols. han demostrado en bacterias Gram-positivas la existencia de un sistema de tres componentes con funcionalidad similar, denominado Aps, compuesto por un sistema regulador clásico de dos componentes histidina kinasa / regulador de respuesta (ApsR / ApsS) y una tercera proteína de función desconocida (ApsX) y que actuaría como regulador maestro de los tres mecanismos de resistencia descritos anteriormente (Li *et al.*, 2007b). Hasta el momento carecemos de datos experimentales sobre el nivel de la expresión de tales mecanismos en las cepas aisladas de comunidad, imposibilitando una identificación más precisa en las mismas. Las imágenes de microscopía electrónica (fig. R.39) muestran que la permeabilización de membrana por los péptidos híbridos cecropina A-melitina subyace al mecanismo letal de los mismos, tanto en la cepa CECT como en las cepas aisladas de comunidad y, aunque en menor medida, sucede también con LL-37. Por otro lado no hemos apreciado diferencias de susceptibilidad a los péptidos asociada a la expresión de LPV, pero desconocemos si dichas cepas expresan y en qué medida otros factores de virulencia asociados, como los péptidos de modulina. Los resultados discutidos avalan la posibilidad de una utilización terapéutica futura de los péptidos híbridos cecropina A-

Resultados y discusión

melitina en la quimioterapia de las infecciones producidas por estafilococos aislados de comunidad, que superan con creces a la catelicidina LL-37 o defensinas. Actualmente, la evaluación de sinergias entre CA(1-7)M(2-9) y otros antibióticos proporciona datos muy prometedores.

4.4. *Acinetobacter baumannii*; PROTEÓMICA DIFERENCIAL ENTRE CEPAS SENSIBLE Y RESISTENTE A COLISTINA. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO RESISTENTE.

4.4.1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años ha sucedido un importante incremento en clínica de *A. baumannii* entre las Gram-negativas multirresistentes (Peleg *et al.*, 2008; Towner, 2009). En numerosas UCIs hasta el 30% de los aislados de *A. baumannii* son resistentes al menos a tres clases de antibióticos, incluyendo carbapenemes y fluoroquinolonas (véase apartado 1.2.3.3). Recientemente se han descrito casos esporádicos de cepas resistentes a colistina, antibiótico empleado en el tratamiento de aislados clínicos multirresistentes y utilizado sólo como último recurso debido a su toxicidad (David y Gill, 2008; Zarrilli *et al.*, 2007). Considerando la capacidad de adquisición de resistencias a antibióticos y xenobióticos en el género *Acinetobacter* (Karageorgopoulos y Falagas, 2008), el confinamiento de dichos aislados es sorprendente, comparado con la diseminación masiva de otras resistencias en esta especie. La explicación más plausible es que el mantenimiento de la resistencia a colistina supone una pérdida de *fitness* de *A. baumannii*, no observada en fenotipos resistentes a otros antibióticos, pero sí en otras bacterias (Andersson, 2006). El coste biológico por mantenimiento de la resistencia supondría una ventaja para la bacteria únicamente bajo presión del antibiótico.

En la última década la proteómica se ha convertido en una herramienta de investigación para el estudio de la resistencia antibiótica en bacterias (Dupont *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008; Roncada *et al.*, 2009). Uno de los estudios proteómicos más completos sobre *A. baumannii* comparó la cepa de referencia ATCC19606 con un aislado clínico multirresistente; el fenotipo resistente se asociaba a diferencias de expresión en la proteína de unión a penicilina 1b, en la proteína CarO y en la OmpW, esta última con polimorfismo en el aislado clínico (Siroy *et al.*, 2006), y cuya menor expresión se asoció a resistencia a colistina en un trabajo anterior (Vila *et al.*, 2007). Mediante proteómica diferencial de resistencia a imipenem en cepas de *A. baumannii* resistentes, se identificó la proteína homóloga a OprD de *P. aeruginosa*, cuya menor expresión es responsable de la resistencia a dicho antibiótico (Dupont *et al.*, 2005). Por otro lado Yun y colaboradores relacionan una menor expresión de las proteínas de membrana OmpA, CarO y OmpW en respuesta a tetraciclina en la cepa *A. baumannii* DU202 (Yun *et al.*, 2008). Recientemente, se ha realizado un análisis proteómico sobre la expresión diferencial de proteínas asociada a las diferentes fases del

Resultados y discusión

crecimiento de la bacteria, donde se demuestra una fuerte resistencia frente al estrés oxidativo en la fase tardía de crecimiento (Soares *et al.*, 2010). Sin embargo los datos en proteómica referentes a la resistencia a colistina en *A. baumannii* son escasos (Vila *et al.*, 2007). El presente trabajo ha realizado una estrategia minimalista, consistente en la comparación de expresión de proteínas tanto citoplásmicas como de membrana, de la cepa ATCC19606 con su isogénica resistente a colistina obtenida en el laboratorio (véase apartado 3.3). La elección de dicho modelo fue motivada por el hecho de que la utilización de colistina en el tratamiento de *A. baumannii* es el último recurso cuando el resto de antibióticos han sido ineficaces, y por la escasez de aislados clínicos isogénicos aislados antes y después del tratamiento con colistina. Como consecuencia se decidió la generación *in vitro* de una la cepa resistente a partir de la cepa de referencia ATCC 19606, para asociar directamente las diferencias observadas entre ambas exclusivamente a resistencia a colistina.

La técnica DIGE (gel de electroforesis diferencial) en proteómica es una alternativa a la repetición masiva de geles 2D-PAGE convencional (Unlu *et al.*, 1997). En DIGE la muestra de un único gel incluye un extracto de proteínas de la cepa sensible, uno de la cepa resistente y un control interno, consistente en mezcla de extractos de las cepas sensible y resistente, cada uno de dichos grupos está marcado con una sonda fluorescente diferente (Cy2, Cy3 o Cy5), sin solapamiento de su espectro de emisión. Al correr en un único gel, se minimizan las diferencias y error experimental causado por la utilización de diferentes geles para cada muestra.

Los resultados en *A. baumannii* resistente y susceptible muestran diferencias en la expresión de 64 proteínas, 35 de las cuales han sido identificadas, incluyendo proteínas de membrana externa, chaperonas y proteínas implicadas en biosíntesis de proteínas, generalmente con infraexpresión en la cepa resistente, que sugeriría una pérdida de *fitness* respecto a la cepa silvestre asociada a la resistencia a colistina, comprobado por diferentes técnicas microbiológicas, y que se postula como un factor de importancia que previene la diseminación masiva de cepas resistentes a colistina.

4.4.2. RESULTADOS.

4.4.2.1. Proteómica diferencial de *Acinetobacter baumannii*.

4.4.2.1.1. Electroforesis bidimensional de las fracciones citoplasmáticas y de membrana de *Acinetobacter baumannii*.

Como etapa previa al estudio de la expresión diferencial de proteínas en resistencia a colistina, se estudió el proteoma de la cepa de referencia ATCC 19606. Para ello se realizó electroforesis bidimensional de las fracciones citosólicas y de membrana en las condiciones descritas en el apartado 3.10. Las figuras R.45 y R.46 muestran las imágenes de los geles bidimensionales de ambas fracciones.

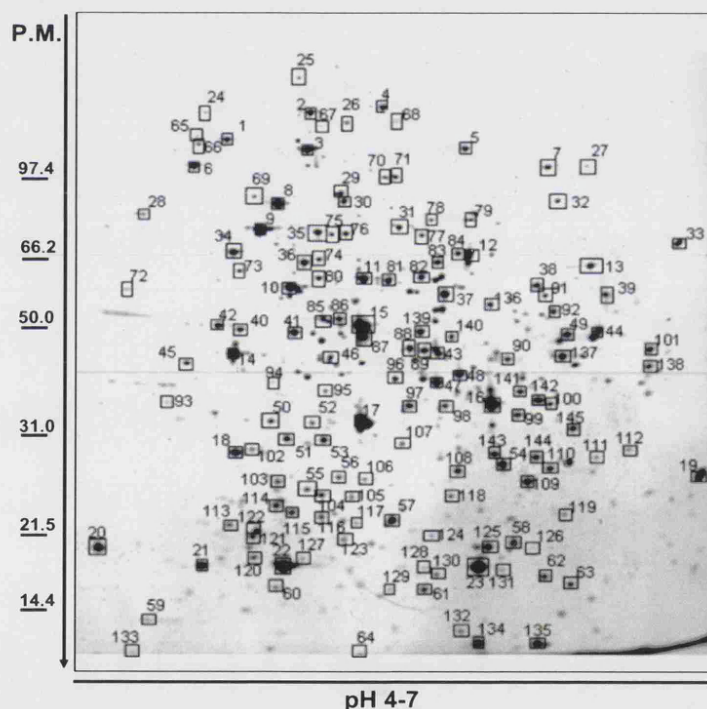


Figura R.45. Electroforesis bidimensional de la fracción citoplásmica de *A. baumannii* ATCC 19606 S^C. Primera dimensión IPG de 17 cm, pH 4-7, segunda dimensión en gel de poliacrilamida al 12%. Tinción de plata compatible con espectrometría de masas. Las manchas analizadas por espectrometría de masas son indicadas por numeración.

De la fracción citoplásmica fueron analizadas 145 manchas de proteínas mediante espectrometría de masas (MS), de las cuales 119 fueron identificadas. De la fracción de proteínas de membrana un total de 62 manchas fueron analizadas y 28 identificadas. Las tablas S.1 y S.2 de material suplementario muestran los resultados obtenidos por MS.

Resultados y discusión

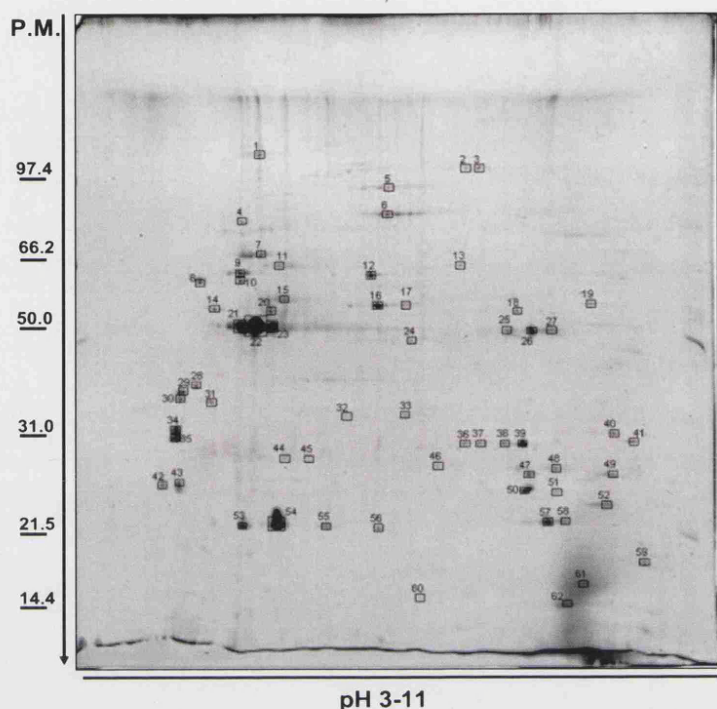


Figura R46. Electroforesis bidimensional de la fracción enriquecida en proteínas de membrana de *A. baumannii* ATCC 19606 S^C. Primera dimensión; IPG de 17 cm, pH 3-11, segunda dimensión en gel de poliacrilamida al 12%. Tinción de plata compatible con espectrometría de masas. Las manchas analizadas por espectrometría de masas son indicadas por numeración.

4.4.2.1.2. Electroforesis bidimensional diferencial (2-D-DIGE) de *A. baumannii* sensible y resistente a colistina de fracciones citoplasmática y de membrana.

Conforme los argumentos presentados en la introducción del presente capítulo, se escogió la técnica 2-D-DIGE para obtener un patrón de expresión diferencial asociado exclusivamente a la resistencia a colistina se compararon las cepas de *A. baumannii* ATCC19606 S^C y su isogénica ATCC19606 R^C (apartado 3.4).

La comparación de la fracción citoplasmática, se realizó mediante 4 réplicas de la cepa sensible con 4 réplicas de la resistente, marcadas con los fluoróforos Cy3 y Cy5 de forma aleatoria (véase fig. M.1); para minimizar la variación experimental se incluyó un patrón interno como estándar, marcado con la sonda Cy2. La figura R.47 es una imagen representativa en uno de los geles tras el análisis de imagen. Un total de 1700 puntos fueron detectados, el estándar interno, Cy2, permitió la codetección de los puntos en cada gel y la normalización de las cuantificaciones.

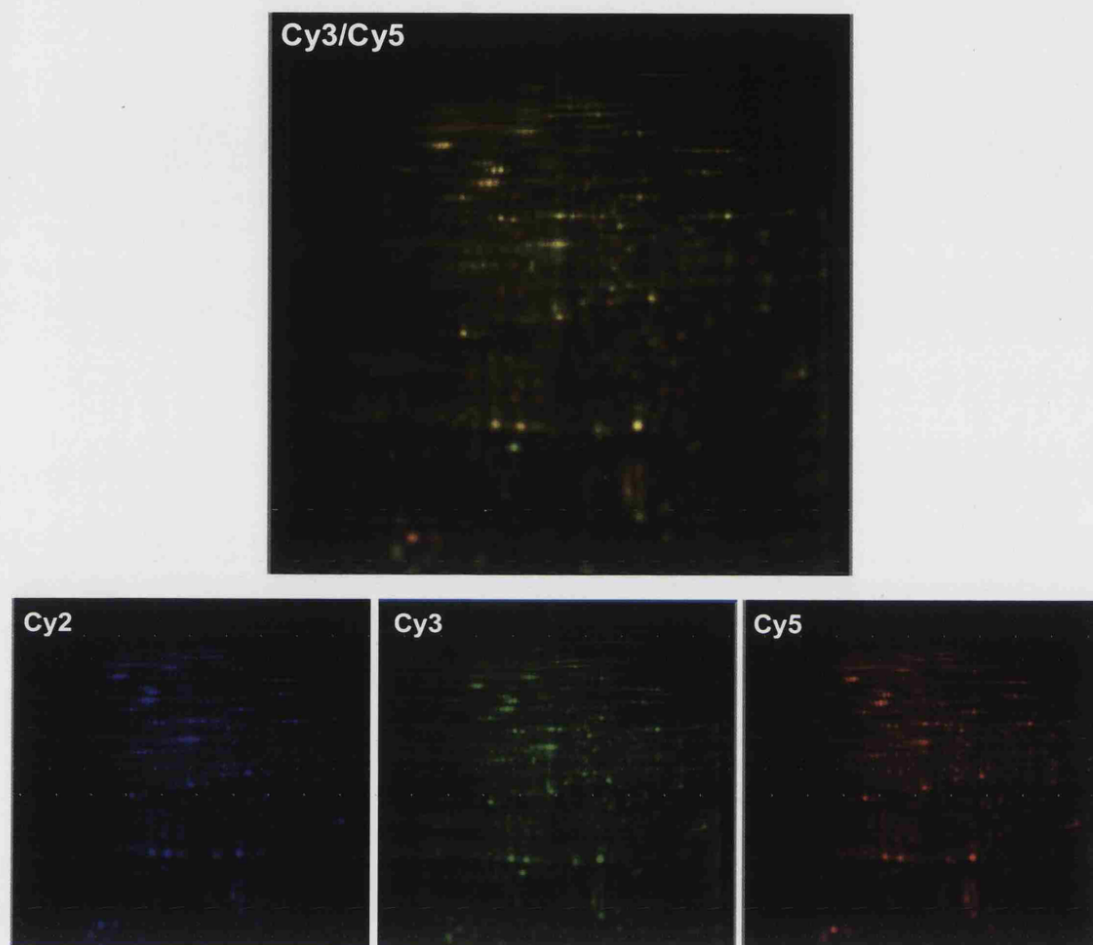


Figura R.47. Comparación mediante 2D-DIGE de la fracción citoplásmica de cepas sensible y resistente a colistina de *A. baumannii*. Primera dimensión IPG 17 cm, pH 4-7, segunda dimensión gel de poliacrilamida 12%. Panel inferior: patrones de fluorescencia de: Cy2, control interno; Cy3; cepa sensible; Cy5; cepa resistente. En el panel superior se observa la superposición de imágenes Cy3/Cy5.

Tras la detección y normalización de manchas de las mismas en los cuatro geles, se identificaron aquellas con diferencias significativas ($p < 0.05$) mediante la prueba de ANOVA con el programa DeCyder. Se definieron 42 manchas de proteínas con una variación en sus niveles de expresión comprendidos entre 3 y -3. Tras análisis por LC-MS/MS y MALDI-TOF por huella peptídica, fueron identificadas 24 proteínas utilizando el motor de búsqueda "MASCOT", limitado a la base de datos específica de *A. baumannii* (tabla R.21).

De idéntica manera se analizó la fracción enriquecida en proteínas de membrana. La figura R.48 muestra las imágenes de uno de los geles incluidos en el ensayo.

Resultados y discusión

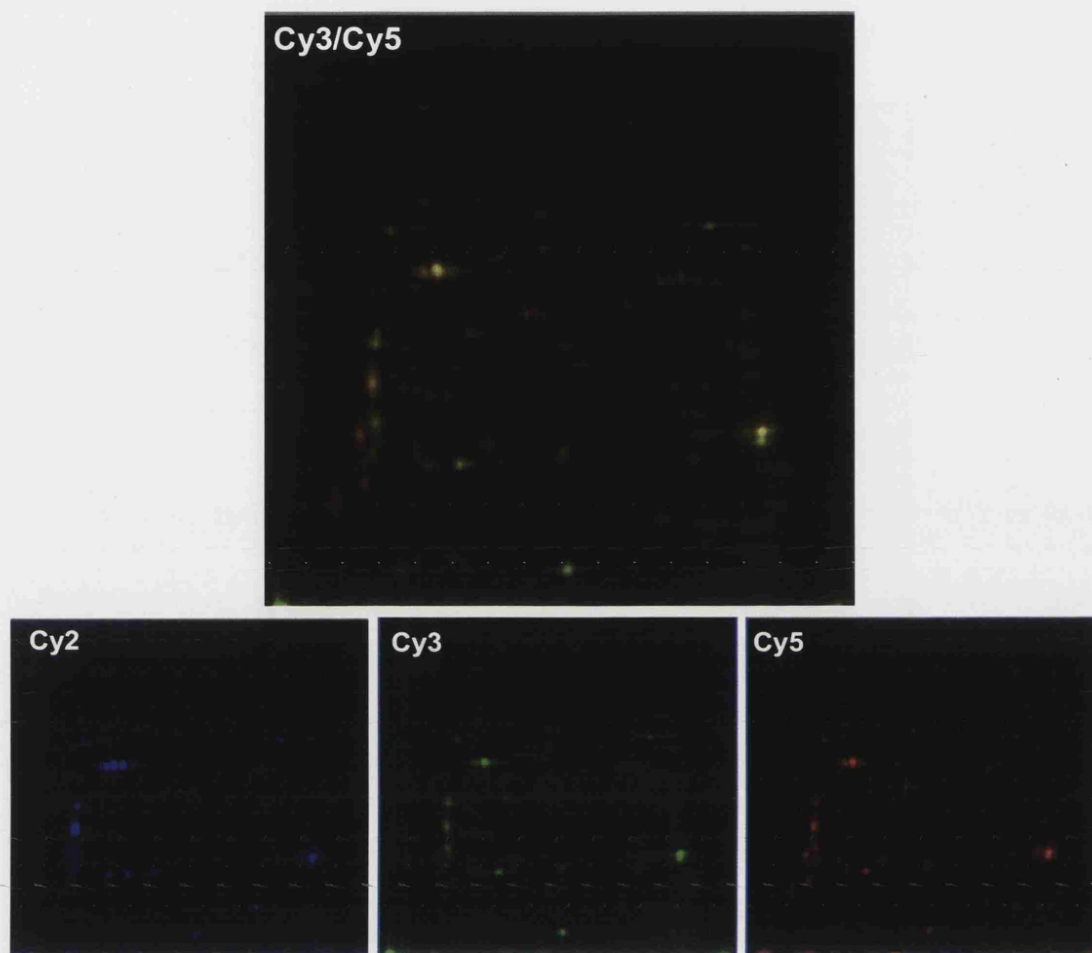


Figura R.48. Comparación mediante 2D-DIGE de la fracción de proteínas de membrana entre cepas sensible y resistente a colistina de *A. baumannii*. Primera dimensión IPG 17 cm, pH 3-11, segunda dimensión gel de poliacrilamida 12%. Panel inferior patrón de fluorescencia de : Cy2, control interno; Cy3; cepa sensible; Cy5; cepa resistente. En el panel superior se observa la superposición de imágenes Cy3/Cy5.

De un total de 1590 manchas proteicas detectadas existían diferencias significativas en los niveles de expresión de 22 de ellas, de las cuales 11 fueron identificadas mediante las técnicas de espectrometría de masas mencionadas anteriormente. En la figura R.49 aparecen numeradas aquellas manchas con expresión diferencial significativa entre ambas cepas. La tabla R.19 muestra las 35 proteínas (lisado total (T) y proteínas de membrana (M)) que se asociaron con la generación del fenotipo resistente en este estudio.

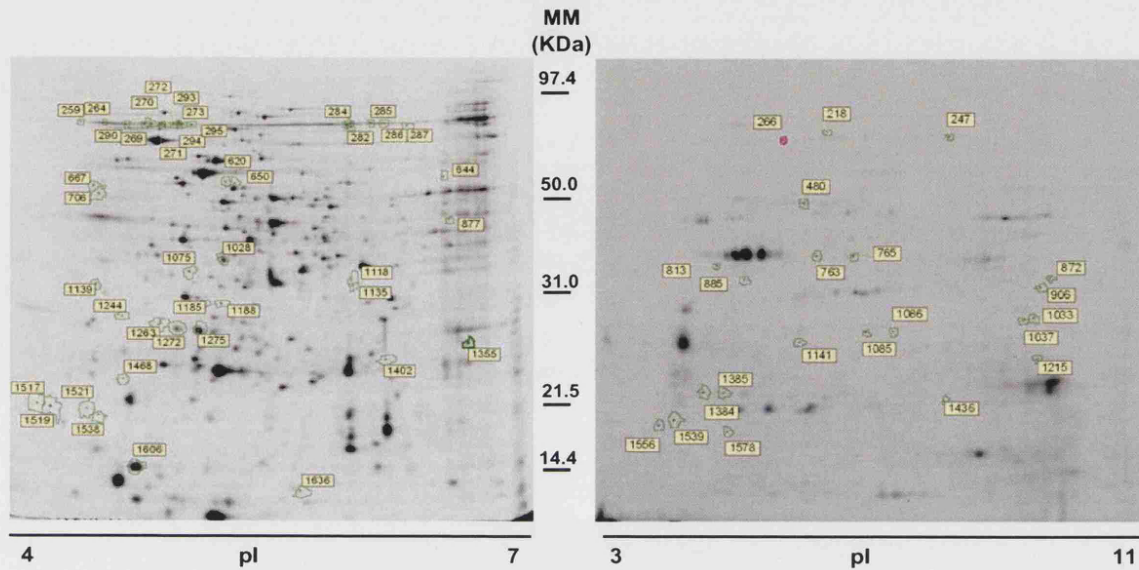


Figura R.49. Electroforesis diferencial de la fracción citoplásmica (derecha) y fracción enriquecida en proteínas de membrana (izquierda) de *A. baumannii* ATCC 19606 S^C y *A. baumannii* ATCC 19606 R^C. La numeración indica las manchas con diferencias de expresión significativa entre ambas cepas.

La mayoría de las proteínas asociadas a la resistencia a PXE están relacionadas con la biosíntesis de proteínas (~ 30%) y otros procesos metabólicos (~ 40%), como regulación de la asimilación de nitrógeno o enzimas relacionadas con el ciclo del ácido tricarboxílico. También existen proteínas implicadas en otras funciones celulares, porinas (~ 11%), proteínas implicadas en la formación de fimbrias (~ 6%), y la proteína OsmY, directamente relacionada con estrés osmótico. (fig. R.50).

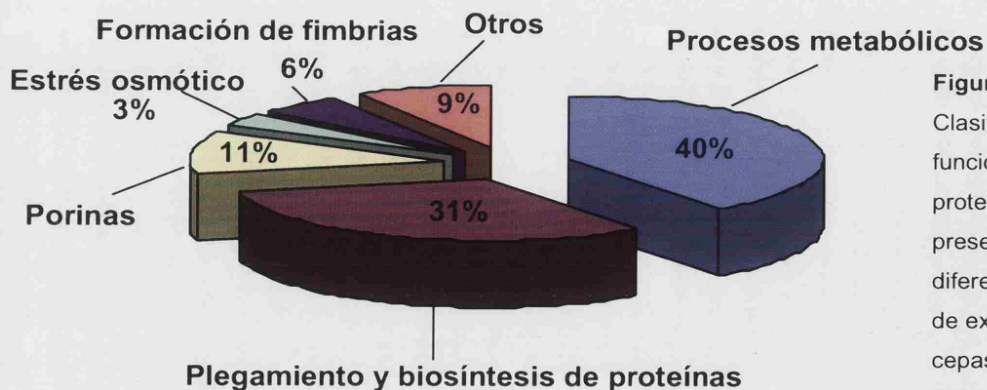


Figura R.50. Clasificación, según su funcionalidad, de proteínas que presentaron diferencias en el nivel de expresión entre las cepas sensible y resistente a colistina de *A. baumannii*.

Resultados y discusión

En la tabla R.21 se resumen las proteínas que presentaron expresión diferencial significativa entre la cepa sensible y la resistente en las fracciones de membrana (M) y citoplasmática (T), así como su función y las diferencias en el nivel de expresión.

Tabla R.21. Proteínas que presentan expresión diferencial en la cepa resistente de *A. baumannii*.

Mancha ^(a)	Nombre	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	Nº de péptidos	Homología (%)	Score	
1085 (M)	Proteína de membrana externa HMP	37793	5.2	Porina	gi21666310	2	7	78	2.88
885 (M)	Proteína de membrana externa A	38397	5.3	Porina	gi40287452	5	14	146	-3.18
1384 (M)	Proteína de membrana externa A	26290	4.7	Porina	gi109675218	5	19	84	-2.86
1556 (M)	Proteína de membrana externa (CarO)	25581	4.5	Porina	gi72535027	5	25	85	-2.35
218 (M)	CsuD	92841	6.0	Componente de fimbrias	gi126642259	4	5	153	3.06
1436 (M)	CsuA/B	18807	5.2	Componente de fimbrias	gi126642263	1	7	70	3.04
1436 (M)	Péptido señal (OsmY)	16557	4.8	Estrés hiperosmótico	gi126386984	1	7	51	2.36
1033 (M)	Proteína ribosomal S2 30S	27507	9.0	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi49531348	3	8	113	2.59
1086 (M)	Peptidasa líder	23242	6.7	Metabolismo	gi126388440	4	20	112	3.45
295 (T)	Factor de elongación de cadena EF-G	79089	5.0	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi49530070	15	21	161	3.17
1042 (T)	Factor de elongación de cadena EF-Tu	43213	5.2	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi49529548	2	5	64	-3.37
1521 (T)	Proteína ribosomal L15 50S	15472	10.9	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi126388961	4	33	128	-3.33
1263 (T)	Proteína ribosomal S3 30S	27964	10.3	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi49532185	5	21	194	3.13
1272 (T)	Proteína ribosomal S3 30S	22047	10.3	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi126388974	7	32	295	4.78
1272 (T)	Triosafosfato isomerasa	26508	4.7	Metabolismo	gi126386296	6	30	291	4.78
620 (T)	Chaperona Hsp60 (GroEL)	57193	4.9	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi126642698	14	21	281	-9.41
650 (T)	Chaperona Hsp60 (GroEL)	57193	4.9	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi126642699	7	11	77	-6.86

Resultados y discusión

Mancha ^(a)	Nombre	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	Nº de péptidos	Homología (%)	Score	R ^(b)
667 (T)	Chaperona Hsp70 (DnaK)	69563	4.7	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi126642981	11	15	178	-3.13
765 (M)	Péptido señal (chaperona HsiJ)	31301	5.9	Plegamiento y biosíntesis de proteínas	gi126386961	3	16	52	-2.69
285 (T)	Isocitrato deshidrogenasa	82876	5.3	Metabolismo	gi126642513	10	13	114	3.21
286 (T)	Isocitrato deshidrogenasa	82876	5.3	Metabolismo	gi126642513	17	17	234	3.3
644 (T)	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	49207	5.7	Metabolismo	gi126387273	16	34	605	3.16
284 (T)	Proteína hipotética MaeB	73653	5.4	Metabolismo	gi126388262	9	14	326	3.16
285 (T)	Proteína hipotética MaeB	82788	5.3	Metabolismo	gi126382263	10	10	268	3.21
1636 (T)	Proteína reguladora de asimilación de nitrógeno P-II 2	10529	5.1	Metabolismo	gi126386195	3	40	125	-8.32
1028 (T)	Glicil-ARNt sintetasa cadena alfa	37200	5.0	Metabolismo	gi126643133	7	18	188	5.72
877 (T)	Serina hidroximetiltransferasa	40519	6.2	Metabolismo	gi126388232	4	12	140	-3.61
1355 (T)	Proteína putativa de biosíntesis de ubiquinona	18059	6.0	Metabolismo	gi126388063	10	55	293	-3.32
1075 (T)	Peroxidasa dependiente de hierro	30322	4.7	Metabolismo	gi126387550	4	13	105	-4.37
1275 (T)	Proteína de biosíntesis de tiamina	22793	4.8	Metabolismo	gi126388190	4	20	190	7.47
1188 (T)	Proteína de biosíntesis de molibdopterina	29293	5.0	Metabolismo	gi126388075	2	11	56	-3.4
1538(T)	Producto del gen aac(6')-I _k	16685	5.5	Metabolismo	gi847647	4	28	61	-4.83
1135 (T)	Proteína hipotética A1S_1372	27170	5.6	Desconocida	gi126641418	5	36	95	-4.94
1468 (T)	Proteína hipotética A1S_3155	18057	6.1	Desconocida	gi126389054	7	37	238	-5.91
1385 (M)	Proteína hipotética conservada	19383	4.9	Desconocida	gi49531733	1	5	62	-2.95

^(a)(M) y (T) se refiere a la fracción de procedencia, extracto de membrana o total respectivamente. ^(b)R se refiere al cociente de sobreexpresión o infraexpresión de la cepa resistente respecto a la cepa sensible.

Resultados y discusión

4.2.2.2. Caracterización del fenotipo resistente.

Tras el análisis proteómico se procedió a la caracterización del fenotipo resistente, con el objetivo de determinar si los cambios de expresión observados son debidos a modificaciones genéticas estables o inestables.

4.4.2.2.1. Ensayos de eficiencia biológica (*fitness*).

- Competencia entre cepas.

En primer lugar se realizó un ensayo *in vitro* de competencia entre *A. baumannii* ATCC19606 S^C y *A. baumannii* ATCC19606 R^C (ver apartado 3.9.1). Los resultados (figura R.51) mostraron que conforme progresa el tiempo, el número de UFCs de la cepa resistente disminuyó drásticamente respecto a la sensible; al sexto día sólo el 4% de las bacterias fueron resistentes al antibiótico.

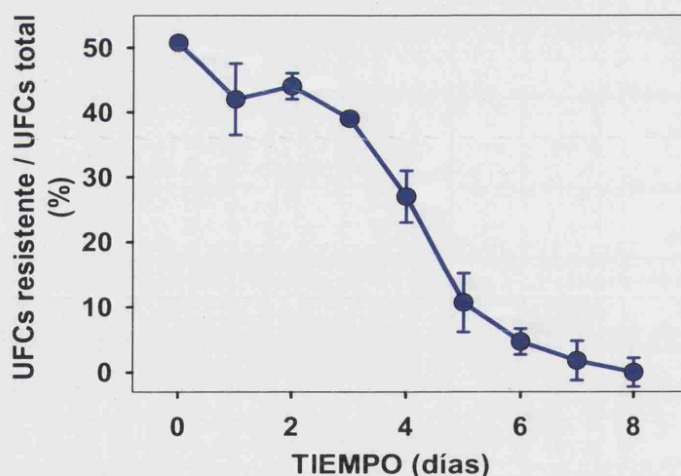


Figura R.51. Ensayo de competencia entre la cepa parental sensible a colistina y su isogénica resistente. Inóculo inicial (10^7 UFC/mL). El porcentaje de sensibles y resistentes fue estimado por crecimiento en placas de alicuotas tomadas en diferentes tiempos, en ausencia y presencia de PXE (32 μ M) a diferentes tiempos.

- Pérdida espontánea de resistencia en ausencia de colistina (PXE).

La pérdida de resistencia observada en el ensayo anterior podría ser debida a varios factores; i) un menor *fitness* de la cepa resistente, en ausencia de PXE, que la cepa parental, ii) inestabilidad del fenotipo de resistencia, con reversión a fenotipo sensible en ausencia de antibiótico o iii) simultaneidad de los dos efectos anteriores. La respuesta a dicha cuestión fue proporcionada por la pérdida espontánea de

resistencia a colistina en la ATCC19606 R^C crecida en ausencia del antibiótico en un lapso de tiempo de 10 días, con determinación de las UFCs del cultivo a diferentes tiempos en ausencia y en presencia de 8 y 32 μ M de PXE (apartado 3.9.2). La figura R.52 muestra los resultados obtenidos.

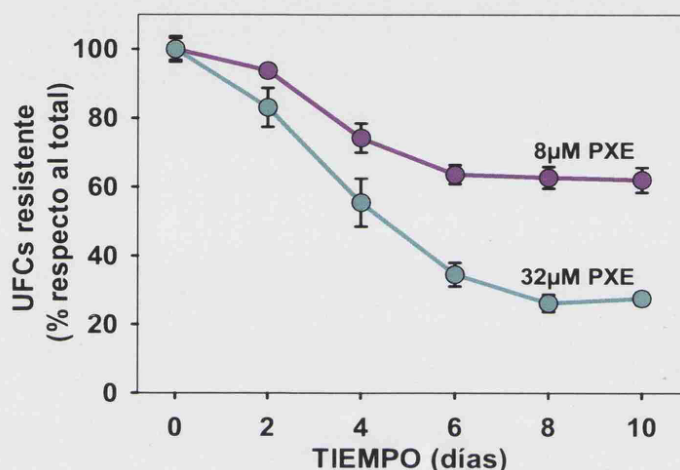


Figura R.52. Pérdida espontánea de resistencia a PXE tras cultivo en ausencia de antibiótico de la de la cepa ATCC19606 R^C. El porcentaje de bacterias resistentes, en función del tiempo, fue estimado por crecimiento en placa en ausencia (100%) y presencia de 8 μ M y 32 μ M de PXE.

Los resultados demuestran una pérdida de resistencia a colistina en función del tiempo, que no alcanza la reversión total, a través de un mecanismo gradual y no por un modelo todo o nada, a tenor de los diferentes porcentajes en las curvas con diferente concentración de PXE. Consecuentemente, la opción más probable para explicar la pérdida de eficiencia biológica de ATCC19606 R^C es su menor capacidad de crecimiento respecto a la cepa susceptible, combinada con una reversión parcial al fenotipo susceptible.

- Permeabilidad de la ME de ambas cepas de *A. baumannii* y susceptibilidad a antibióticos.

Basados en los cambios en la expresión de proteínas de ME, y su importancia como barrera de impermeabilidad a antibióticos, se decidió ensayar si dichas modificaciones afectaban tal función. Se utilizó la inhibición de crecimiento en presencia del detergente Triton X-100 (apartado 3.9.4) debido a que la solubilización de la MI sólo sucede si ME se encuentra suficientemente desestructurada. La cepa resistente fue mucho más susceptible al detergente que la cepa sensible (figura R.53), con LD₅₀, de 0.005% (p/v) y >0.1% para la cepa resistente y sensible respectivamente. Conforme a la composición de la hemicapa externa formada casi exclusivamente por

Resultados y discusión

LPS y a la menor expresión de porinas, como canales de acceso al espacio periplásmico, dichos resultados sugieren un empaquetamiento defectuoso del LPS de la cepa resistente, originando discontinuidades que explicarían la mayor susceptibilidad a la lisis por el detergente.

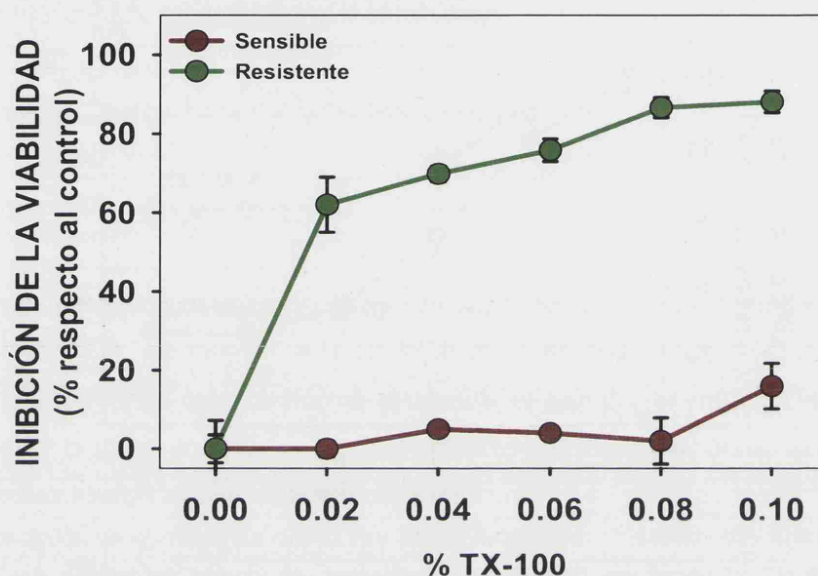


Figura R.53. Inhibición del crecimiento bacteriano por TX-100 de las cepas de *A. baumannii* sensible y resistente a colistina.

El mayor tiempo de generación de la cepa resistente, así como la menor expresión de proteínas ribosomales en la misma, sugiere un deterioro en la biosíntesis de proteínas, y como tal, mayor sensibilidad a los antibióticos que inhiben dicho proceso. Esta hipótesis fue demostrada por la susceptibilidad significativamente mayor de la cepa resistente respecto a la silvestre a dos antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas (puromicina y cloramfenicol) (tabla R.22).

Tabla R.22. Actividad de puromicina y cloramfenicol sobre *A. baumannii*

Antibiótico	<i>*A. baumannii</i> S ^C		<i>*A. baumannii</i> R ^C	
	CMI	CMI ₅₀	CMI	CMI ₅₀
Puromicina	>100.0	76.0 (± 6.0)	>100.0	47.8 (± 1.9)
Cloramfenicol	>100.0	82.0 (± 1.0)	100.0	26.7 (± 1.8)

CMI y CMI₅₀ (μM) * (± Desviación estándar). S^C: Cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 sensible a colistina, R^C: Cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 resistente a colistina.

Puesto que la resistencia a PXE ha supuesto una mayor susceptibilidad a otros antibióticos (Li *et al.*, 2007a), los datos anteriores se complementaron con el estudio de susceptibilidad de ambas cepas frente a un conjunto de antibióticos mediante el método de difusión en disco (tabla R.23) sin que existieran diferencias significativas a los mismos entre ambas cepas.

Tabla R.23. Antibiógramas de *A. baumannii*.

Antibiótico	<i>A. baumannii</i> S ^C * (mm)	<i>A. baumannii</i> R ^C * (mm)
Ampicilina (10µg)	0	0
Penicilina G (10ud)	0	0
Imipenem (10µg)	30	30
Gentamicina (10µg)	16	17
Ciprofloxacina (5µg)	30	28
Amikacina (30µg)	20	20
Rifampicina (5µg)	13	14

*Diámetro del halo de inhibición de crecimiento. S^C: Cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 sensible a colistina, R^C: Cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 resistente a colistina

• Susceptibilidad de las cepas *A. baumannii* al sistema del complemento.

La membrana externa actúa como primera barrera bacteriana frente al sistema inmune y más especialmente frente a los sistemas de inmunidad innata, incluyendo, además de los péptidos antibióticos, al complemento. Los ensayos realizados sobre la viabilidad de ambas cepas tras la exposición al suero humano por 1 h no mostraron diferencias significativas entre ellas (fig. R.54).

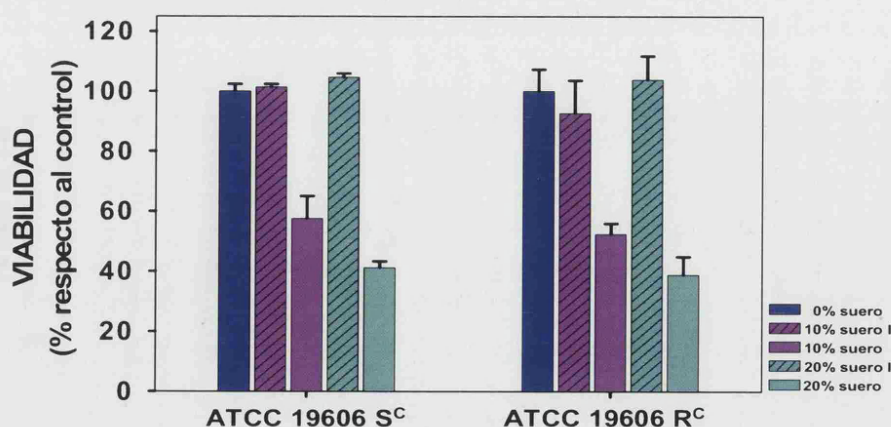


Figura R.54. Viabilidad de las de la cepas de *A. baumannii* ATCC19606 S^C y ATCC19606 R^C tras 1 h de incubación en medio MHII más 10% ó 20% de suero humano inactivado por calor (suero I) o sin inactivar (suero) y posterior incubación en medio MHII a 37°C durante 12 horas. El crecimiento se determinó por DO_{590nm}. EL control (100% viables) se obtuvo mediante incubación en MHII en ausencia de suero.

Resultados y discusión

• Unión de DPXB a *Acinetobacter baumannii* sensible y resistente a colistina.

La afinidad de la ME para polimixina se determinó mediante valoración de la unión de dansil-polimixina B a las bacterias, que fue considerablemente superior para la cepa sensible. Las bacterias fueron visualizadas a la máxima concentración de DPXB ensayada mediante microscopía de fluorescencia (fig. R.55).

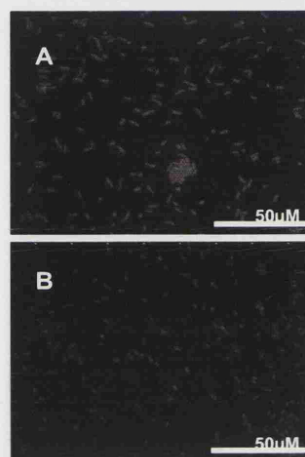
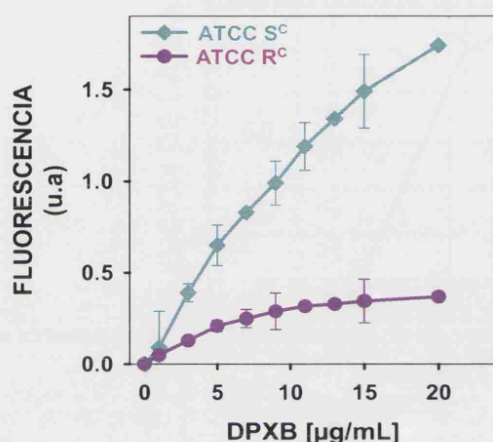


Fig. R.55. Afinidad de PXB por la membrana de las bacterias. El panel izquierdo muestra el incremento de fluorescencia ($\lambda_{Ex}=340, \lambda_{Em}=460$) tras la adición de DPXB, la imagen de la derecha muestra la diferencia de fluorescencia observada. A: cepa sensible. B: cepa resistente.

4.4.2.2.3. Ensayos de virulencia de las cepas.

• Formación de *biofilm* bacteriano.

La formación de *biofilm* bacteriano es un factor de virulencia de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Sawhney y Berry, 2009; Van Houdt y Michiels, 2005). La valoración de la capacidad de formación de *biofilm* de ambas cepas de *A. baumannii*, por fijación de cristal violeta, demostraron que la cepa R^c no formó *biofilm* tras 24 h de crecimiento, ni en ausencia (-PXE) ni en presencia (+PXE) de colistina, mientras que la cepa parental sí lo hizo (fig. R.56). En la tabla R.24 resume los valores de DO_{595nm} correspondientes a la fijación del colorante.

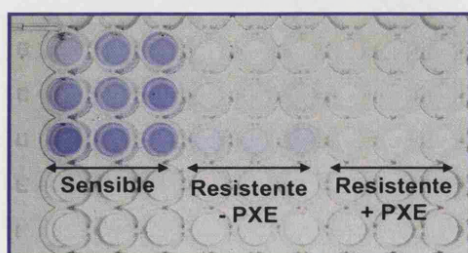


Figura. R.56. Imagen de formación de *biofilm* (cristal violeta) de las cepas sensible y resistente a colistina en presencia (+PXE) y ausencia (-PXE) de colistina.

Tabla R. 24. Formación *biofilm* por *A. baumannii*.

<i>A. baumannii</i>	<i>Biofilm</i>
ATCC S ^c	0.25 (± 0.04)
ATCC R ^c (-PXE)	0.02 (± 0.01)
ATCC R ^c (+PXE)	0.01 (± 0.00)

• Inhibición del crecimiento de *D. discoideum*.

D. discoideum es utilizado como modelo de virulencia bacteriana (Smith *et al.*, 2007). Al alimentarse por fagocitosis de bacterias, se ha comparado la inhibición del crecimiento de la ameba en presencia de ambas cepas de *A. baumannii*. Para dicho ensayo, el inóculo consistió en una mezcla equivalente en UFCs de la cepa correspondiente de *A. baumannii* con *Klebsiella aerogenes* (ver apartado 3.9 5). La figura R.57 muestra el diámetro del halo de crecimiento de *D. discoideum* en cada caso, así como las imágenes de las placas que ilustran el mayor crecimiento de la ameba en presencia de la cepa resistente.

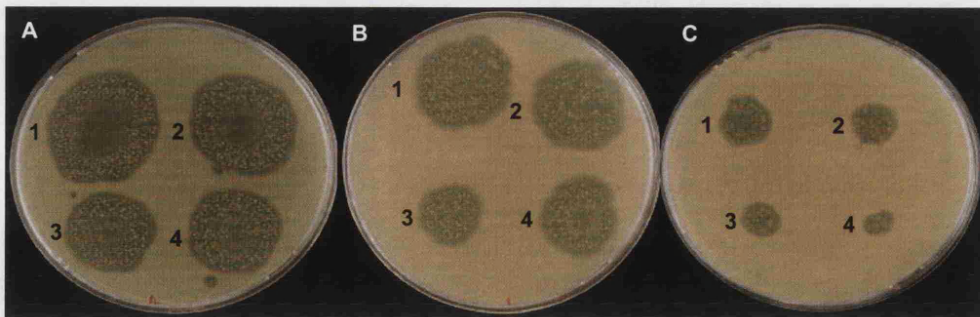
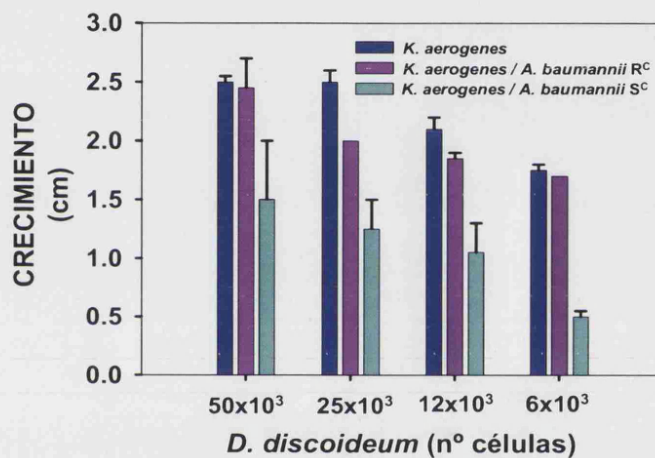


Fig. R.57. Tamaño de los halos de crecimiento de *D. discoideum* en presencia del *K. aerogenes* y *K. aerogenes* con la cepa resistente o sensible a colistina (Panel superior). En el panel inferior se muestran las imágenes de las placas A: control (*K. aerogenes*), B: *K. aerogenes* / *A. baumannii* ATCC R^C y C: *K. aerogenes* / *A. baumannii* ATCC S^C.

Una serie posterior de experimentos se diseñaron para responder a las cuestiones surgidas: i) Si la inhibición del crecimiento era causada por toxinas secretadas al medio por *A. baumannii*. Para ello, las amebas se cultivaron sobre *K. aerogenes* en presencia de los sobrenadantes de cultivos de *A. baumannii* (fig. R.57), ii) Si la

Resultados y discusión

inhibición del crecimiento persistía en *A. baumannii* muertas y iii) Determinar el crecimiento de la ameba en presencia únicamente de *A. baumannii*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R.58. Los dos primeros puntos resultaron negativos, y respecto al tercero, la utilización exclusiva de *A. baumannii* vivas, inhibía tanto el crecimiento como el desarrollo de la ameba.

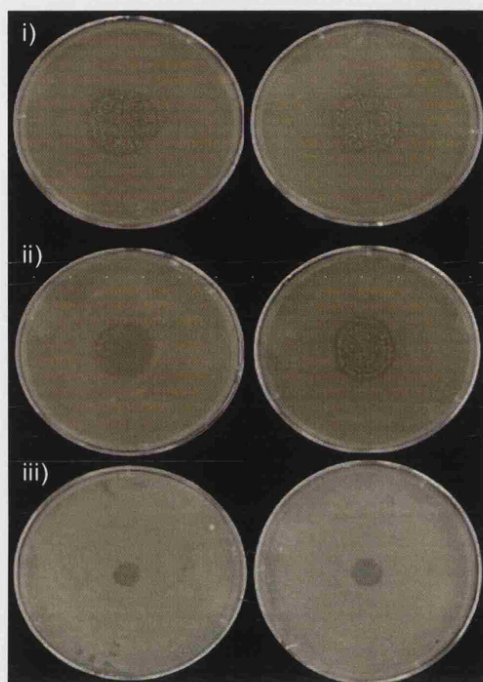


Fig. R.58. Crecimiento de *D. discoideum* sobre *K. aerogenes* en presencia de: i) sobrenadante de cultivo de *A. baumannii*, ii) cultivo muerto de *A. baumannii* y iii) Crecimiento de *D. discoideum* sobre césped de *A. baumannii*. Cepas sensible (panel izquierdo) y resistente (panel derecho) a colistina,

- Infección de macrófagos Raw 264.7.

Otro de los ensayos realizados para evaluar la virulencia de las cepas fue el de infección de células de la línea macrofágica murina RAW 264.7, con determinación del número de bacterias viables intracelulares tras 2 horas de infección. Los resultados obtenidos fueron 4.6×10^6 bacterias / 2.5×10^5 macrófagos y 5.7×10^6 bacterias / 2.5×10^5 macrófagos para la cepa sensible y resistente a colistina respectivamente, resultando ésta última con una mayor infectividad.

4.4.2.2.4. Caracterización metabólica de las cepas.

Con el fin de complementar las diferencias de expresión de las enzimas implicadas en procesos metabólicos, definidas por DIGE, se ensayó la capacidad de crecimiento de ambas cepas sobre sustratos determinados como única fuente de carbono utilizando las placas GN2 de 96 pocillos (ver apartado 3.9.6). Entre ambos tipos de bacterias, sólo mostraron diferencias para la utilización de citrato como única fuente de carbono (figura R.59).

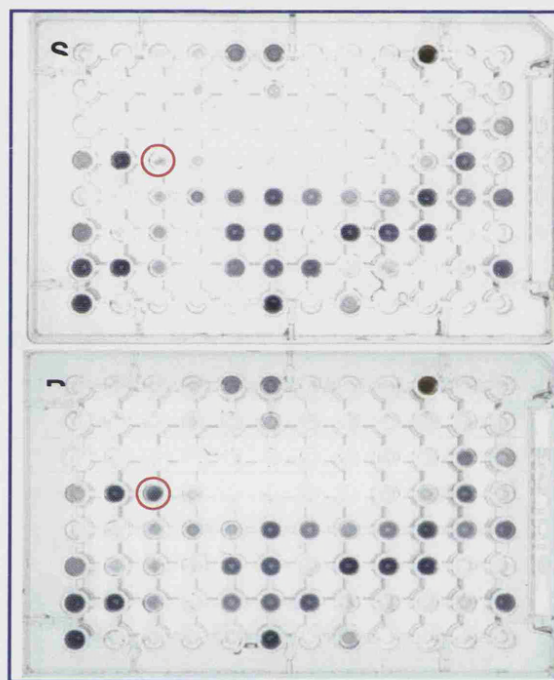


Fig. R.59. Crecimiento de *A. baumannii* cepas sensible (S) y resistente (R) en presencia de diferentes fuentes de carbono. El círculo rojo indica el pocillo correspondiente al citrato, que presentó diferencias significativas de crecimiento.

4.4.3. DISCUSIÓN.

Tal y como ya ha sido mencionado en capítulos anteriores de esta tesis, los antibióticos, a pesar de su incidencia esencial en la disminución de la mortalidad por infecciones bacterianas, han originado la emergencia de patógenos resistentes y multirresistentes a los mismos. Consecuentemente, en la actualidad se requiere el desarrollo de nuevas estrategias eficaces para combatir las infecciones bacterianas (Smith y Romesberg, 2007). En este sentido, conocer los mecanismos por los que las bacterias contrarrestan la acción de los antibióticos y adquieren resistencia a los

Resultados y discusión

misimos permitiría una mayor eficacia en el desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas. La resistencia a colistina en descrita en cepas de *A. baumannii* multirresistentes a otros antibióticos ha realizado la necesidad de investigar los mecanismos por los que la bacteria adquiere dicha resistencia. La estrategia utilizada en el presente trabajo es minimalista, y para tal se ha evitado un modelo clínico de cepa, que aunque más similar a la situación real, adolece de una posible interacción y/o entre los mecanismos de resistencia a diferentes antibióticos obtenidos previamente al tratamiento con colistina. Por otro lado, se ha querido realizar una relación más directa utilizando niveles de expresión de proteínas. Los siguientes apartados de esta discusión establecerán en la medida de lo posible, las diferencias observadas entre los fenotipos de resistencia y susceptibilidad a colistina obtenidas mediante metodologías diversas y complementarias.

Permeabilidad y composición de membrana.

Según los resultados obtenidos mediante DIGE hay expresión diferencial en tres porinas, todas pertenecientes a la familia de las OmpA. De ellas, sólo la numerada como 885 (GI40287452) presenta idéntico PM y pI que la proteína teórica (tabla R.21). Las otras dos (1085, gi21666310 y 1384 gi109675218), se pueden interpretar como productos de degradación de las especies preexistentes. Una de ellas (1085) es la porina HMP, la mayoritaria descrita en *A. baumannii* (Dupont *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 2007), cepas de *A. baumannii* resistentes a tigeciclina, imipenem o colistina han presentado alteración en los niveles de expresión de porinas de dicha familia (del Mar Tomas *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2008). Así mismo se ha descrito sobre-expresión en la porina OmpA asociada a la resistencia a colistina en *S. typhimurium* (Bader *et al.*, 2003), otra porina de *A. baumannii* con expresión disminuida en un aislado resistente a colistina es OmpW (Vila *et al.*, 2007). Nuestros resultados además muestran infraexpresión de CarO en la cepa resistente (1556, gi72535027), dicho comportamiento ha sido descrito previamente en resistencia a imipenem, ya que CarO facilita su entrada (Sirov *et al.*, 2005). Sin embargo, el fenotipo de la cepa resistente a colistina no muestra resistencia a dicho antibiótico, conforme al diámetro de difusión en disco (tabla R.23). Considerando las perturbaciones en la arquitectura de la ME, en la cepa resistente a colistina, el imipenem podría acceder al espacio periplásmico a través de dichas discontinuidades (ver punto 4.4.2.2.1).

Conforme fue mencionado en la introducción de esta tesis, el principal mecanismo de las enterobacterias para adquisición de resistencia a las polimixinas consiste en la remodelación del LPS con disminución de su carga negativa, mediante conjugación de

Resultados y discusión

etanolamina (EtN) o 4-amino-L-arabinosa (Ara4N) a los grupos fosfatos del lípido A, con disminución de la afinidad LPS-PX, principalmente mediado por los sistemas de dos componentes PhoPQ y PmrAB, comunicados entre si por PmrD en otras bacterias (Moon y Gottesman, 2009; Moskowitz *et al.*, 2004).

A partir de los datos de genoma de *A. baumannii* (Smith *et al.*, 2007) conocemos que esta especie carece del sistema de PhoPQ y pmrD. Por eliminación, sólo el sistema PmrAB sería el responsable de la remodelación. En efecto, mutaciones en dicho sistema se asocian a resistencia a colistina en *A. baumannii*, y datos iniciales en colaboración con el grupo del Dr. J. Pachón, Hospital Universitario Virgen del Rocío las confirman en *A. baumannii* ATCC19606 R^C, la cual presenta expresión constitutiva de *pmrA*. De las dos modificaciones del LPS dependientes de PmrAB, los genes que codifican las enzimas implicadas en la conjugación de Ara4N no están presentes (Adams *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2009); presumiblemente, es la conjugación de EtN al lípido A la responsable del proceso de resistencia. Nuestros resultados obtenidos mediante DIGE no revelan diferencias de expresión de ninguna de las enzimas implicadas en este proceso, y que nos permitan confirmar que este es el mecanismo por el cual la cepa resistente adquiere dicho fenotipo.

Otras proteínas de interés son CsuA/B (1578, gi126642263) y CsuD (218, gi126642259) codificadas ambas por el mismo operón e implicadas en la formación de fimbrias (Tomaras *et al.*, 2003). La presencia de fimbrias favorece la adhesión bacteriana a las superficies y por tanto la formación de biofilm, que es un factor de virulencia para la bacteria (Rodríguez-Bano *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2009). A pesar de que nuestros resultados muestran sobreexpresión en la cepa resistente de estas proteínas, posee una menor capacidad de formación de *biofilm* comparada con la silvestre (fig. R.56).

En la cepa resistente a colistina aparece sobreexpresada la proteína 1436 (gi126386984), anotada como un péptido señal, asignación errónea simplemente atendiendo a su masa molecular, y que presenta un elevado porcentaje de homología con OsmY, una proteína periplásmica pequeña (Yim y Villarejo, 1992), cuya inducción está asociada con estrés hiperosmótico y con la actividad de la polimixina en *E. coli* (Oh *et al.*, 2000; Yim y Villarejo, 1992). Las proteínas de la familia OsmY se caracterizan por reestablecer la homeostasis celular, permitiendo la supervivencia de la bacteria bajo condiciones osmóticas desfavorables. Se supone que de manera semejante a la polimixina, también actúe proporcionando conexión entre las capas periplásmicas de la MI y ME (Liechty *et al.*, 2000). Dado que se ha descrito que las polimixinas llevan a cabo el intercambio de fosfolípidos entre las dos monocapas, basado en modelos de membranas biológicas, provocando la pérdida de asimetría de

Resultados y discusión

la membrana (Cajal *et al.*, 1996), la sobreexpresión de OsmY podría competir con la colistina, incrementando la resistencia al antibiótico al impedir dicho intercambio.

Biosíntesis de proteínas.

Los resultados de 2D-DIGE también revelan variación en los niveles de expresión de proteínas implicadas en la biosíntesis de proteínas. Así, en la fracción enriquecida en proteínas de membrana existe una sobreexpresión de la proteína ribosomal S2 en la cepa resistente a colistina (1033, gi49531348). Este incremento de expresión, el cual persiste tras los lavados realizados destinados a la eliminación de contaminantes de la fracción citosólica, se relacionaría con la sobreexpresión de la peptidasa lider 1086, gi126388440, un componente del complejo SRP (partícula de reconocimiento de señal), implicada en la correcta inserción y translocación de proteínas de membrana y secretadas. Es interesante resaltar que en *E. coli* la proteína ribosomal S2, perteneciente a la subunidad 30S, interacciona con el extremo N-terminal de OmpA según sobresale del ribosoma (Choi *et al.*, 1998) y con el ARN 4.5S de SRP, además de otras proteínas ribosomales (Gu *et al.*, 2005). Tanto este componente de SRP como la proteína ribosomal S2 están sobreexpresadas en la cepa resistente, que se interpretaría como un intento de la célula por garantizar una correcta translocación de proteínas a través de la membrana interna, en un ambiente donde tanto la biosíntesis global de proteínas como los niveles de expresión de chaperonas se encuentran disminuidos. La sobreexpresión de la peptidasa lider en *Listeria monocytogenes* se encuentra asociada a una mejor invasión de células de mamífero, al asegurar el procesamiento correcto de factores de virulencia (Raynaud y Charbit, 2005).

La cepa resistente de *A. baumannii* presenta un tiempo de generación mayor al de la cepa silvestre, 62 y 40 minutos respectivamente. El crecimiento bacteriano está directamente asociado con la síntesis de proteínas y a su vez al número de ribosomas activos (Kaczanowska y Ryden-Aulin, 2007). La resistencia a colistina supone un desequilibrio en los niveles de expresión de los factores de elongación EF-G (295, gi49530070) y EF-Tu (1402, gi49529548) sobre- e infraexpresados respectivamente, y de proteínas ribosomales como L15 (1521, gi126388961), implicada en la integración del ARNr 5S al ribosoma (Kaczanowska y Ryden-Aulin, 2007). Sin embargo L15 no es esencial en la biosíntesis de proteínas (Ito *et al.*, 1984); hay cepas de *E. coli* que no expresan dicha proteína, pero que duplican su tiempo de generación (Franceschi y Nierhaus, 1990), en cierto modo semejante a la situación en *A. baumannii*. La proteína ribosomal S3 también aparece sobreexpresada en la cepa resistente a colistina, identificada en dos manchas (1263, gi49532185 y 1272, gi126388974), y que

Resultados y discusión

garantizan un adecuado control de las etapas finales de la traducción de proteínas, ya que tanto S2 como S3 están implicadas en el ensamblaje de la subunidad pequeña del ribosoma (Culver y Noller, 1999).

Un resultado llamativo de 2D-DIGE es la infraexpresión de chaperonas mayoritarias, como Hsp60 (GroEI) (620, gi126642698), Hsp70 (DnaK) (650, gi126642699) y HsiJ (765, gi126386961). Este hecho puede originar errores en el plegamiento de las proteínas con pérdida de funcionalidad de las mismas. La consecuencia final de la resistencia a colistina implicaría un deterioro global en el mantenimiento de la funcionalidad de proteínas y como consecuencia de la homeostasis de la bacteria, que se traduce en el menor *fitness* observado en la cepa resistente.

Metabolismo.

Los datos obtenidos por 2D-DIGE fueron completados con la caracterización metabólica de ambas cepas por crecimiento en placas GN2, donde cada pocillo contiene una única fuente de carbono. La diferencia más significativa entre ambas cepas fue el mayor crecimiento de la cepa resistente en presencia de citrato como única fuente de carbono comparada con la cepa silvestre (fig. R.59), que se relacionaría con la sobreexpresión de la isocitrato deshidrogenasa (285 y 286, gi126642513) observada en la cepa resistente. En consecuencia *A. baumannii* R^C tendría una mayor dependencia del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para sus requerimientos metabólicos. Otra enzima relacionada con esta observación es la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (644, gi126387273), sobreexpresada en esta misma cepa, e implicada en la producción de equivalentes redox mediante transformación de sustratos hidroxilados en cetoacil-CoA con formación de NADH. Dicha enzima presenta alta homología con la enzima 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, que produce acetil-CoA procedente del catabolismo de ácidos grasos y aminoácidos. El acetil-CoA generado alimentaría el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, u otras rutas anabólicas.

Las manchas 284 (gi126388262) y 285 (gi126388263) sobreexpresadas en la cepa resistente, fueron anotadas como la proteína hipotética MaeB (enzima málica), con alta homología a sus ortólogos de otras bacterias. MaeB cataliza la descarboxilación oxidativa del malato, ligada a la reducción de nucleótidos de adenina. Su papel en este contexto podría ser el desvío de parte del malato generado en el ciclo TCA a piruvato que a su vez alimentaría la ruta glucogénica.

Resultados y discusión

Un incremento del ciclo TCA podría aumentar los niveles de oxoglutarato, que conjuntamente con la glutamina, sirve a la bacteria para conocer y controlar la asimilación de nitrógeno. En la cepa resistente a colistina, la intensidad de la mancha 1636 (gi126386195), anotada como sistema regulador PII de la asimilación de nitrógeno está notablemente reducida. Este sistema, compuesto por dos proteínas GlnK y GlnB de baja masa molecular se encarga de controlar la entrada compensada de nitrógeno y carbono con el fin de evitar un consumo de energía innecesario (Leigh y Dodsworth, 2007). Esta regulación es mediada a través de una proteína de membrana, AmtB, que actúa como poro para NH_4^+ , y es inactivada por la unión de GlnK, reduciendo la entrada de NH_4^+ y su eventual incorporación a glutamina (Javelle *et al.*, 2004). En la cepa resistente, la menor expresión de GlnK podría favorecer la síntesis de glutamina, de acuerdo con los niveles de oxoglutarato esperados de un ciclo TCA acelerado.

En la cepa resistente hay una sobreexpresión considerable de la subunidad alfa de la glicil-ARNt sintetasa (1028, gi49532234), una de las pocas ARNt sintetasas bicomponentes, que no es acompañada de otras ARNt sintetasas. Una posible explicación sería asegurar un nivel adecuado de glicil-ARNt para la biosíntesis de proteínas en el caso de un déficit de glicina, causado por la infraexpresión de serina hidroximetiltransferasa (877, gi126388232), enzima clave en la biosíntesis de dicho aminoácido (Magnusson *et al.*, 2003). Dado el papel fundamental que la glicina juega en el metabolismo de fragmentos de un carbono, su escasez podría afectar, entre otros, a la biosíntesis de purinas y glutatión, con las consiguientes consecuencias sobre el metabolismo global.

Otra de las proteínas infraexpresadas en la cepa resistente (1355, gi126388063) es una enzima implicada en la biosíntesis de ubiquinona, cuyos niveles de ubiquinona se relacionan directamente con el contenido de O_2 en el medio (Soballe y Poole, 1999), y dado el carácter aerobio de *Acinetobacter*, un déficit en el nivel de la misma podría obstaculizar seriamente la capacidad metabólica de la bacteria, además de un posible incremento de la producción de metabolitos oxigenados (Soballe y Poole, 1999), cuyo efecto se vería agravado por la infraexpresión de la peroxidasa (1075, gi126387550), con un aumento en los niveles de peróxido peróxido. Este incremento en los niveles de ROS podría contribuir a la disminución del *fitness* metabólico de la cepa resistente. La utilización de antibióticos que estimulan la producción de ROS ya han sido utilizados para otras bacterias (Dwyer *et al.*, 2007; Macvanin *et al.*, 2004).

Otra de las proteínas con sobreexpresión en la cepa resistente es la 1275 (gi126388190), implicada en la biosíntesis de tiamina. En su forma trifosfato, la tiamina actúa como señal de crecimiento de *E. coli* bajo disponibilidad restringida de

Resultados y discusión

aminoácidos (Lakaye *et al.*, 2004).

Finalmente, la técnica de DIGE, también revela la infraexpresión de 1188 (gi126388075), una proteína implicada en la biosíntesis de molibdopterina, un cofactor de oxidoreductasas. En anaerobios facultativos como *E. coli*, las molibdoenzimas ayudan al crecimiento de la bacteria en condiciones limitantes de oxígeno (Soballe y Poole, 1999). Para un aerobio estricto, como *Acinetobacter*, esta posibilidad es poco probable. Por otro lado, una nitrato reductasa con un cofactor molibdopterina, ha sido descrito en *A. calcoaceticus* (Villalobo *et al.*, 1977), y en el genoma de *A. baumannii* aparecen tanto nitrato y nitrito reductasa, y un transportador de nitrato, sugiriendo que *Acinetobacter* reduciría el NO_3 a NH_4 . Incluso si este proceso es inhibido parcialmente por la ausencia de molibdopterina, se podría compensar por la mencionada infraexpresión de la proteína GlnK, que provoca un incremento de la entrada de NH_4 mediada por AmtB.

Resistencia a colistina y susceptibilidad a antibióticos.

Otros autores han descrito en cepas de *A. baumannii* resistentes a colistina y generadas *in vitro* una mayor susceptibilidad a otros antibióticos (Li *et al.*, 2007a). En 2D-DIGE se ha detectado infraexpresión del producto del gen *aac* (6')-Ik (1538, gi847647), una N-acetiltransferasa implicada en la inactivación por acetilación de la posición 6' de aminoglicósidos como amikacina, kanamicina, netilmicina y trobamicina, pero no gentamicina (Ploy *et al.*, 1994), pero esta suposición no ha sido confirmada en la susceptibilidad a aminoglicósidos ensayados (tabla R.23). De hecho, *Acinetobacter* no depende de estos genes para la resistencia a aminoglicósidos, si no que la consigue mediante una amplia variedad de actividades enzimáticas (Bonomo y Szabo, 2006). Otra diferencia es la sobreexpresión de CarO (1556), implicada en la entrada de imipenem a través de la ME (Siroy *et al.*, 2005) y que tampoco se plasma en la práctica, comentado en el punto de permeabilidad.

Finalmente existen otras tres manchas cuya funcionalidad se desconoce. Para la mancha 1468 (gi 126389054) y la 1385 (gi 49531733), se ha encontrado alta homología con proteínas de otras bacterias, que desgraciadamente tampoco tienen funcionalidad asignada. Para la mancha 1135 (gi126641418) la escasa homología que presenta con la hidroximetilglutaril CoA liasa imposibilita una interpretación correcta de su función.

El análisis global de todos los resultados obtenidos demuestra un fenotipo de resistencia a colistina en desventaja con respecto al silvestre, por un lado la resistencia revierte al eliminar la presión del antibiótico (fig. R.52) y por otro los

Resultados y discusión

ensayos de competición muestran el sobrecrecimiento de la cepa sensible desplazando a la resistente. Los ensayos en *D. discoideum* son un claro ejemplo de la mayor eficiencia biológica de la cepa con fenotipo sensible, en concordancia a datos anteriores en *A. baumannii* multirresistente utilizando *D. discoideum* como modelo de virulencia (Smith *et al.*, 2007).

Una publicación reciente analiza las diferencias en la morfología y topografía entre cepas de *A. baumannii* sensibles y resistentes a diferentes concentraciones de colistina mediante microscopía de fuerza atómica, los resultados mostraron menor tamaño y mayor rugosidad de superficie en las cepas resistentes (Soon *et al.*, 2009) concordantes con el menor tamaño de la cepa resistente frente a la sensible (fig. R.55). En resumen, podríamos decir que el *fitness* de la bacteria resistente es resultado de una compensación entre la supervivencia bajo presión del antibiótico y el excesivo gasto metabólico requerido para el mantenimiento de la misma. Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una importante información acerca de los mecanismos de adaptación por los que la bacteria adquiere resistencia a colistina, y que de poder ser extrapolados al ámbito clínico, señalarían dianas cuya inhibición causaría la destrucción de la reprogramación metabólica inherente a la resistencia a colistina como ARNt sintetasa, inhibidores del ciclo de los TCA o chaperonas. Inhibidores de dichos sistemas ya han sido descritos anteriormente en otras bacterias (Pohlmann y Brotz-Oesterhelt, 2004; Singh y Ghosh, 2006).

Resultados y discusión

4.4.4 MATERIAL SUPLEMENTARIO.

Tabla S.1. Proteínas identificadas en el extracto total de *A. baumannii* ATCC 19606.

Mecha proteica	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	% Homología	Puntuación
1	64889	5.34	Dihidrolipoamida S-acetiltransferasa E2 componente del complejo piruvato deshidrogenasa.	gi126389218	18	130
2	95400	4.90	Aconitato hidratasa 2.	Gi126642171	67	105
3	73796	4.90	Factor de elongación EF-G	Gi126640918	55	247
4	100644	5.01	Aconitato hidratasa.	gi50086100	4	174
5	73653	5.40	Proteína hipotética MaeB.	gi126388262	9	155
6	64453	4.74	Chaperona Hsp 70.	gi126642981	44	301
7	78334	5.82	Subunidad α del complejo de oxidación de ácidos grasos.	gi49529577	4	67
8	52659	5.57	30S Proteína ribosomal S1	gi126641617	29	109
9	50038	4.71	Chaperona Hsp60	gi126642698	65	323
10	44460	5.21	Subunidad β , región de unión a membrana de ATP sintasa F ₁ .	gi126640256	69	311
11	55534	5.29	Subunidad α ATP sintasa	gi162286757	36	217
12	25504	5.97	Proteína hipotética A1S_2187	gi126642232	40	83
	51884	5.43	Acetil-CoA hidrolasa/transferasa putativa	gi126643239	21	76
13	42487	5.64	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	gi126388632	30	363
14	36928	4.90	Succinil-CoA sintetasa ,subunidad β	gi126388633	25	304
15	33152	4.78	Factor de elongación EF-Tu	gi126640368	36	112
16	25048	5.07	Succinil-CoA sintetasa, cadena α	gi126388634	31	227
17	30805	5.27	Factor de elongación EF-Ts	gi126642362	32	88
	35358	5.20	Malato deshidrogenasa	gi152032571	47	171
18	20716	4.70	Subunidad alfa de la flavoproteína transferente de electrones	gi126388546	33	114
19	23108	5.20	Subunidad α de la flavoproteína de transferencia de electrones	gi126642663	43	123
20	42487	5.64	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	gi126388632	8	31
21	19331	4.68	Pirofosfatasa inorgánica	gi49529493	21	101
22	18316	4.96	Alquil hidroperóxido reductasa, subunidad C22	gi126387137	18	107
23	24207	5.88	Superóxido dismutasa	gi126388267	17	136
24	92941	4.88	Aminopeptidasa N	gi126388021	26	337

Resultados y discusión

Macha proteica	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	% Homología	Puntuación
25	113472	5.00	Carbamoyl-fosfato sintasa, subunidad grande.	gi126388602	43	1431
26	92706	5.17	Proteasa dependiente de ATP, Hsp 100.	gi126641234	30	189
27	70250	6.33	Proteína de degradación de ácido fenilacético (paaN).	gi126641381	30	102
28	46410	4.46	Factor L de transcripción/terminación/antiterminación	gi126640415	24	126
29	60509	5.11	Prolil-ARNt sintetasa.	gi126388727	31	426
30	62480	5.27	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	gi126388586	50	345
31	56080	5.34	Isocitrato liasa	gi126641058	38	167
32	64505	6.07	Subunidad flavoproteína de la succinato deshidrogenasa	gi126642744	47	221
33	46303	6.22	IMP deshidrogenasa	gi126643328	33	122
34	39843	4.61	Chaperona molecular para el factor de formación de septo	gi126386432	26	269
35	29023	5.11	Glutamina sintetasa	gi126388273	27	298
36	49921	5.20	Proteína hipotética A1S_1295	gi126641341	39	143
37	40519	6.22	Serina hidroximetiltransferasa	gi126388232	24	236
38	45221	5.76	Fumarasa C	gi126387915	18	151
39	46736	6.10	L-24-diaminobutirato: 2-cetoglutarato 4aminotransferasa	gi126642490	36	145
40	38545	4.96	Proteína de unión de GTP y GTPasa homóloga a tubulina	gi126389222	54	456
41	43112	5.12	Enolasa	gi126387827	13	108
42	40880	5.10	Aspartato aminotransferasa A.	gi126642544	44	149
43	29637	5.40	Succinilornitina transaminasa.	gi126643147	52	93
	40671	5.32	Treonina sintasa, enzima piridoxal-5' dependiente de fosfato.	gi50083540	39	90
44	33691	5.86	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	gi126389051	10	94
45	35540	4.47	Fosfoglicerato quinasa.	gi126387472	6	107
46	34695	5.01	Subunidad α ARN polimerasa.	gi126643071	58	170
	36939	5.42	Proteína A de membrana externa.	gi129307154	31	79
47	28969	5.08	Isomeroeductasa de ácido acetohidroxi.	gi126640616	46	87
48	34182	5.46	Fructosa-1,6-bisfosfatoaldolasa, clase II	gi126387473	26	310
49	32227	5.91	Proteína WeeE.	gi126640168	28	95
50	27475	4.84	Tioredoxina reductasa.	gi126386809	27	58
51	26227	5.27	Proteasa/amidasa intracelular putativa.	gi126388679	33	81
	32458	5.00	Malato deshidrogenasa.	gi126388924	29	53
52	36839	6.82	Proteína hipotética CsuE.	gi379333551	30	83

Resultados y discusión

Macha proteica	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	% Homología	Puntuación
53	25896	5.31	Dihidropicolinato sintasa.	gi126389314	46	236
54	24510	5.39	Proteína hipotética A1S_2674	gi126388592	13	116
55	19230	5.25	Dinelacona hidrolasa putativa.	gi126389321	24	46
56	29761	5.17	Tetrahidroxi piridina-2-carboxilato N-succiniltransferasa putativa.	gi126642574	69	178
57	9260	4.53	Proteína hipotética A1S_0323.	gi126386289	24	144
58	11581	9.52	Proteína ribosomal 50S L23.	gi126388977	20	117
59	18807	5.25	Proteína CsuA/B.	gi37933546	33	87
61	18536	5.40	Precursor de la peptidil-prolil cis-trans isomerasa.	gi50085061	57	102
62	22103	5.81	Proteínas bifuncionales: 4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa, 2-ceto-4-hidroxiglutarato aldolasa.	gi49529757	15	44
66	84990	4.78	Fenilalanil-ARNt sintetasa, subunidad β .	gi126386555	36	585
67	71225	4.97	Polirribonucleótido nucleotidil transferasa.	gi126640439	35	547
67	95400	4.99	Aconitato hidratasa.	gi50085482	36	275
68	99184	5.58	Piruvato descarboxilasa E1 componente del complejo piruvato deshidrogenasa.	gi126643335	29	197
69	72049	4.89	Chaperona Hsp90, proteína de choque térmico.	gi45529563	20	336
71	74956	5.20	Metionil ARNt sintetasa	gi126386720	39	335
	74480	5.12	Catalasa	gi126386369	15	126
73	48108	4.93	Aspartil/glutamil-ARNt (Asn/Gln) amidotransferasa, subunidad B.	gi126388698	15	78
75	2903	5.11	Glutamina sintetasa.	gi126388273	10	32
76	52200	5.20	Fosfoglicerato mutasa III, independiente de cofactor.	gi126640323	19	110
77	51438	5.29	Malato deshidrogenasa	gi126386125	39	429
78	61503	5.41	Acil-CoA deshidrogenasa	gi126642910	23	139
79	57576	5.40	CTP sintasa.	gi126387829	13	246
81	55534	5.29	ATP sintasa F ₀ F ₁ subunidad alfa.	gi162286757	21	108
81	42075	5.08	Aldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD.	gi126642488	30	96
82	51495	5.53	Fumarato hidratasa.	gi126640553	42	137
83	45831	5.54	Succinilglutámico semialdehído deshidrogenasa.	gi126389029	11	231

Resultados y discusión

Macha proteica	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	% Homología	Puntuación
84	42982	4.98	Aspartil/glutamil-ARNt (Asn/Gln) amidotransferasa subunidad A	gi126388697	17	222
85	44845	4.93	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa (EPT).	gi49529866	8	101
86	33152	4.78	Proteína factor elongador de cadena EF-Tu	gi126640368	29	85
87	41025	5.41	Isocitrato deshidrogenasa	gi126642511	32	109
87	43213	5.20	Proteína factor elongador de cadena EF-Tu, posible factor de unión a GTP (duplicado de tuf A).	gi50083572	32	87
88	37702	5.46	Cadena pequeña carbamoil-fosfato sintasa.	gi126388601	19	88
89	31973	6.40	Metionina adenosiltransferasa.	gi126641564	58	155
91	44089	6.23	Cadena F NADH deshidrogenasa I.	gi126640814	34	125
92	39786	5.81	Gamma-glutamil fosfato reductasa.	gi126386444	17	224
93	36537	4.77	Transaldolasa.	gi126387994	29	264
94	37580	5.04	Deshidratasa de ácido delta-aminolevulinico.	gi126386840	37	279
95	35542	5.14	3-fosfoserina aminotransferasa.	gi126388536	13	170
96	31246	5.17	Putativa UDP-glucosa 4-epimerasa.	gi126386062	28	218
97	35454	5.36	Subunidad de la cisteína sintetasa A y O-acetilserina sulfhidrolasa A, enzima dependiente de PLP.	gi49530795	10	136
98	30804	5.78	Succinil-CoA sintetasa cadena alfa.	gi49531888	18	102
99	34566	5.67	Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa	gi126640885	39	112
100	29146	5.11	UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa.	gi126386059	10	115
101	30590	6.31	Transferasa de aminoácidos de cadena ramificada.	gi126388812	16	125
	30426	6.39	Subunidad catalítica de la aspartato carbamoil transferasa.	gi126387122	11	66
103	27176	4.98	Regulador de respuesta (activador) de sistema regulador de dos componentes (familia OmpR).	gi50083946	47	112
104	20631	4.83	Adenoilato quinasa.	gi126386957	60	173
105	22491	4.93	Putativa oxoacil-reductasa.	gi126386031	22	186
107	28151	5.01	Acetilglutamato quinasa.	gi126386822	43	206
108	23384	5.48	Dihidrodipicolinao reductasa.	gi126389333	57	300
109	28797	5.61	Enoil-ACP reductasa dependiente de NAD.	gi126640605	36	138
111	22550	7.93	Sistema regulador de dos componentes.	gi126643237	34	94
113	25759	4.54	Cadena alfa de triptofano sintasa.	gi126642894	50	127
114	19327	4.78	Factor P de elongación.	gi126642455	30	83

Resultados y discusión

Mecha proteica	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	% Homología	Puntuación
115	20586	4.79	Fosforribosilaminoimidazolsuccinocarboxamida sintasa.	gi126643432	43	108
117	16382	4.94	Ribosa-5-fosfato isomerasa	gi126387844	21	55
118	24871	4.97	Ferredoxina-NADP+ reductasa.	gi126388218	45	309
121	26181	4.96	Fosforribosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida isomerasa.	gi126643246	52	145
123	17204	5.01	Proteína supresora de DNaK.	gi126386225	64	234
125	18356	5.10	Anhidrasa carbónica putativa.	gi126386918	34	157
128	24207	5.88	Superóxido dismutasa [Fe]	gi126388267	4	53
130	17333	5.77	Subunidad proteolítica Clp dependiente de ATP (endopeptidasa Clp)	gi126386433	45	237

Resultados y discusión

Tabla S.2. Proteínas identificadas en la fracción de membrana de *A. baumannii* ATCC 19606.

Macha proteica	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	% Homología	Puntuación
1	92497	5.17	Proteína de membrana externa putativa.	gi126387898	10	169
5	67700	6.08	Proteína de membrana externa receptor de cobre putativa.	gi126386155	16	299
9	44460	5.21	Proteína de unión a membrana ATP sintasa, sector F1, subunidad β .	gi126386140	64	827
11	36939	5.42	Proteína A de membrana externa.	gi129307154	28	92
13	44818	5.79	Proteína putativa (tipo DcaP)	gi126388668	16	202
	51612	6.23	IMP deshidrogenasa	gi38720	10	159
14	38545	4.96	Proteína de división celular, tipo tubulina de unión a GTP y GTPasa.	gi126643338	23	88
15	33152	4.78	Factor de elongación EF-Tu.	gi126386252	23	450
18	37622	6.15	Proteína de choque térmico Hsp40.	gi126389334	14	153
19	23108	5.20	Flavoproteína de transferencia de electrones subunidad β .	gi126388547	25	128
20	43033	5.29	Porina sensor de glucosa (tipo OprB)	gi126388757	54	780
	33152	4.78	Factor de elongación EF-Tu.	gi126386252	15	215
21	36939	5.42	Proteína A de membrana externa.	gi129307154	31	118
22	37342	5.13	Proteína A de membrana externa.	gi126642864	45	172
23	36939	5.42	Proteína A de membrana externa.	gi129307154	29	125
26	38096	7.02	D-Ala-D-Ala-caarboxipeptidasa; protea 5 de unión a penicilina (precursor).	gi126642471	17	78
27	38096	7.02	D-Ala-D-Ala-caarboxipeptidasa; protea 5 de unión a penicilina (precursor).	gi126388355	26	197
28	32095	4.77	Proteína de membrana externa de 34 kDa.	gi82654966	12	83

Resultados y discusión

Macha proteica	PM	pl	Función	Nº Acceso NCBI	%Homología	Puntuación
29	32095	4.77	Proteína de membrana externa de 34 kDa.	gi82654966	20	354
30	32095	4.77	Proteína de membrana externa de 34 kDa.	gi82654966	32	99
34	24757	4.50	Proteína de membrana externa putativa.	gi72535025	32	412
35	24757	4.50	Proteína de membrana externa putativa.	gi72535025	31	89
36	24010	5.32	Proteína de transporte putativa.	gi126387170	15	110
47	38397	5.32	Proteína A de membrana externa.	gi40287452	10	79
50	36939	5.42	Proteína A de membrana externa.	gi129307154	32	97
52	22529	9.30	Proteína de membrana externa putativa.	gi126386818	52	536
56	16998	6.74	Xantina fosforibosiltransferasa.	gi126388934	16	140
62	15994	8.83	Hemolisina putativa.	gi126387251	52	230
62	9720	8.83	Lipoproteína de membrana externa.	gi126386828	67	198

DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

5.1. La membrana plasmática como diana en la quimioterapia antiinfecciosa.

La membrana plasmática (MP) constituye una barrera para el acceso de la mayoría de antibióticos a sus respectivas dianas excepto para aquellas moléculas que difunden libremente a través de ella. Dicho proceso está rigurosamente controlado por sistemas transportadores y poros que imponen estrictos requerimientos estructurales para su internalización. Por ello, variaciones en los citados sistemas son responsables de un primer nivel de resistencias a los agentes antimicrobianos basados en dificultar su acceso a las respectivas dianas intracelulares (Hopkins *et al.*, 2005).

Tal es el caso de la resistencia a imipenem en *A. baumannii*, causada por mutación de la porina CarO (Siroy *et al.*, 2006), la resistencia a linezolid de *Staphylococcus* (Sierra *et al.*, 2009; Woodford y Livermore, 2009), o la mutación en la aminofosfolípido translocasa responsable de la internalización de miltefosina en *Leishmania* (Perez-Victoria *et al.*, 2003). Sin embargo, en quimioterapia, el número de antimicrobianos de naturaleza peptídica que utilizan la membrana como diana final es muy reducido. Entre ellos los casos más representativos en clínica son; la gramicidina S y las polimixinas B y E (colistina) (Mogi y Kita, 2009). En estas últimas, la permeabilización de membrana es un efecto secundario, producido a concentraciones muy superiores a la letal (Daugelavicius 2001). Más recientemente se ha incorporado a este escaso arsenal la daptomicina, antibiótico esencialmente activo frente a Gram-positivos (Pirri *et al.*, 2009). En *Leishmania*, los únicos fármacos comerciales activos en membrana son la anfotericina y polienos relacionadas, que aprovecha su unión preferente a ergosterol sobre el colesterol para la permeabilización preferente de la membrana del parásito (Croft *et al.*, 2006).

Dicha escasez de ejemplos en quimioterapia contrasta con la amplia utilización de la membrana como diana en la naturaleza. Numerosas toxinas utilizan su unión preferente a determinados componentes de la misma, la neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y otras citolisinas de bacterias Gram-positivas dependientes de colesterol, que tras su unión al mismo, nucleon un poro transmembrana de gran tamaño provocando lisis celular (Heuck *et al.*, 2010; Marriott *et al.*, 2008). La esfingomielina es el ligando de interacción para las actinoporinas de las anémonas (Alvarez *et al.*, 2009) o la lisenina de los anélidos (Shogomori y Kobayashi, 2008). En comparación, la acción de los PAs es el resultado de una interacción estequiométrica de los mismos con los fosfolípidos de la membrana, cuya especificidad se basa esencialmente en la preferencia de unión determinada por la carga eléctrica de signo opuesto entre ambos.

Discusión general

5.2. Péptidos ensayados en el presente estudio.

La obtención de análogos de péptidos antibióticos naturales por modificación química de los mismos persigue diferentes fines: optimización de secuencias respecto a su actividad microbiciada (Burton y Steel, 2009), definición de relaciones estructura-actividad (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2008), optimización de su índice terapéutico (Guerrero *et al.*, 2004), e incremento de su estabilidad frente a la degradación proteolítica (Meng y Kumar, 2007). La selección de los péptidos empleados en el presente estudio ha pretendido demostrar la importancia de modificaciones, en apariencia nimias, sobre la modulación de la actividad de cabezas de serie ya ensayados previamente y, en lo posible, la definición de la relación estructura-actividad.

Los grupos estudiados han sido análogos del PA híbrido CA(1-7)M(2-9) donde un diferente número (mono-, di- o pan-) de sus residuos de lisina se encuentran trimetilados en su grupo ϵ -NH₂. La actividad del péptido parental, previamente descrita en los tres modelos objeto de estudio de este trabajo (Chicharro *et al.*, 2001; Giacometti *et al.*, 2004; Saugar *et al.*, 2006), fue modulada significativamente por dichas sustituciones. El resultado final es un incremento importante del IT especialmente en el caso de los análogos mono- trimetilados.

Como PA de origen procariota se ha elegido GS, péptido utilizado esencialmente sobre infecciones cutáneas de Gram-positivos (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2009) y únicamente restringido a ciertos Gram-negativos (Lee *et al.*, 2004). Por su toxicidad, la administración parental del mismo no ha sido empleada, y como tal, tampoco ensayada en leishmaniasis, incluso en sus manifestaciones cutáneas, sin embargo sí lo ha sido sobre otros eucariotas inferiores como hongos y levaduras (Lee *et al.*, 2004), así como en el protozoo parásito intracelular *Plasmodium falciparum* (Rautenbach *et al.*, 2007). Algunas de las modificaciones realizadas en la región del giro β II' del péptido reducen la actividad hemolítica del mismo, con ITs superiores al péptido parental en los tres modelos estudiados. Finalmente, se evaluó la actividad de un grupo reducido de péptidos híbridos cecropina A-melitina sobre aislados de comunidad de *S. aureus*, ensayados anteriormente en *S. aureus* (Bowdish *et al.*, 2005; Giacometti *et al.*, 2004) como patrón de actuación de péptidos exógenos y fue comparada con el péptido humano catelicidina LL-37, como PAE endógeno.

5.3. Elección de las dianas biológicas objeto del presente estudio.

Los tres patógenos escogidos comparten una importancia funcional en clínica; la grave y creciente incidencia de aislados resistentes y multirresistentes a sus farmacopeas respectivas, consecuentemente con la casi total extinción de la panoplia de antimicrobianos disponibles contra ellos. Simultáneamente representan tres modelos diferentes de membrana diana para estos péptidos. A pesar de que el mecanismo letal de permeabilización de membrana plasmática sea muy similar entre PAs, existe una “firma propia” específica para cada interacción péptido-patógeno, determinada, además de por las características propias de cada PA, por tres factores principales del patógeno: i) la presencia de barreras externas, ii) expresión de proteasas, iii) diferencias no sólo en el contenido, sino en la composición de fosfolípidos aniónicos constituyentes de su membrana plasmática.

i) Barreras externas a la membrana plasmática.

Quizá la barrera más exigente y complicada para el acceso a la membrana plasmática de los PAs en los tres modelos utilizados sea la membrana externa de las bacterias Gram negativas, en este caso representadas por *A. baumannii*. La casi exclusividad del LPS como componente no proteico de la hemicapa externa y su entrecruzamiento entre moléculas vecinas, determina que bajo condiciones fisiológicas, el acceso al periplasma se realice para las moléculas hidrofílicas a través de las porinas. Las condiciones de interacción de PAs con LPS es debida en su etapa temprana a la interacción electrostática entre los mismos, con desplazamiento de los cationes divalentes implicados. El principal mecanismo de resistencia a PAs en las bacterias Gram-negativas supone modificaciones que cursan con pérdida del carácter aniónico del LPS. Como tal, el ensayo sobre una cepa de *A. baumannii* resistente a colistina es un reto para los PAs por sus similitudes estructurales con la misma, refrendada por la literatura que describe resistencias cruzadas entre colistina y otros PAs. En *Salmonella spp.* (Gunn, 2008) y *Escherichia coli* (Warner y Levy, 2010) la resistencia a PXB es paralela a LL-37 y a la β -defensina humana 1. En *P. aeruginosa* la exposición a concentraciones subletales de indolicidina induce la expresión de genes implicados en la resistencia a PXB y a otros PAs (Gooderham *et al.*, 2008). Los resultados de actividad obtenidos en este trabajo sobre *A. baumannii* muestran que la relación de CMI para CA(1-7)M(2-9) entre cepas susceptibles y resistentes a colistina es inferior a dos, mientras que para colistina es de 8 veces. Puesto que la trimetilación de lisinas supone un cierto apantallamiento de su carga positiva del átomo de

Discusión general

nitrógeno cuaternario causada por sus tres grupos metilos, los péptido trimetilados presentarían una menor capacidad para desorganizar la membrana externa, al matizar más su interacción con LPS y, consecuentemente, serán más sensibles a las variaciones estructurales del LPS. Este hecho explicaría que las diferencias de efectividad para un péptido dado entre cepas susceptibles y resistentes a colistina sean ligeramente superiores para los análogos con lisinas trimetiladas que para el péptido parental.

Sin embargo, el resultado experimental es el global de la permeabilización tanto de la membrana externa como de la interna, donde no se establece la etapa limitante o discriminativa. Aunque los péptidos trimetilados no han sido ensayado en sistemas bacterianos libres de barreras externas, como son los esferoplastos, su permeabilización por otros péptidos cecropina melitina es similar para aquellos obtenidos de aislados susceptible o resistente a colistina, (Saugar *et al.*, 2006) que sugeriría que la interacción con el LPS podría ser la mayor responsable de dicha discriminación. La diferencia de actividad respecto a las cepas susceptibles y resistentes a colistina es menos notable en las gramicidinas (tablas R10 y R15) que para los CA(1-7)M(2-9) y sus análogos trimetilados, primero porque en éstas su carga iónica debido exclusivamente a sus dos grupos Orn en un decapeptido, son inferiores cuantitativamente a la de los péptidos cecropina A-melitina, y quizás, y más importante, por su rigidez estructural impuesta por su carácter cíclico y mantenimiento de la hoja β , que dificulta extraordinariamente la interacción óptima con los grupos catiónicos del LPS, comparados con la mayor flexibilidad estructural y accesibilidad en la interacción de las lisinas de los péptidos cecropina A-melitina, incrementado por la existencia de un grupo metileno adicional en la cadena lateral de las lisinas. Como resumen, en ambos casos modificaciones muy localizadas y en apariencia que preservan las características estructurales de los péptidos, más en gramicidina S que en cecropina A-melitina, han logrado un incremento del IT y como tal, la posibilidad futura de un desarrollo clínico de los mismos. (Saugar *et al.*, 2002; Saugar *et al.*, 2006),

El modelo Gram-positivo *S. aureus*, carente de membrana externa, posee como barrera previa a la membrana plasmática el peptidoglicano. En éstas, la resistencia a PAs posee idéntica base conceptual, la disminución de la carga negativa de esta primera barrera, lograda en este caso mediante esterificación de los grupos aniónicos de ALTs por D-Ala, mediada por el gen *dlt* (Kraus *et al.*, 2008). En este caso la cepa control de *S. aureus* es aproximadamente dos veces más susceptible a los PAs que los aislados de comunidad la CMI, sin embargo se desconoce el nivel de esterificación de ALTs. Su responsabilidad en las citadas diferencias no es conocida, como tampoco

Discusión general

lo es la expresión de *dlt*. De intervenir, sería de forma muy parcial, ya que la susceptibilidad a los PAs en cepas donde se ha eliminado dicho gen son al menos un orden de magnitud superior (Peschel *et al.*, 1999{Abi Khattar, 2009 #583).

En comparación con las dos anteriores barreras, en *Leishmania*, únicamente se interpone entre el medio externo y la membrana plasmática el glicocáliz, especialmente relevante en el promastigote por su densidad y su carácter aniónico. El LPG de *Leishmania* está implicado en la resistencia a PAs tanto en el vector invertebrado, como en etapas iniciales de la infección en macrófagos (Bera *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2006), cepas deficientes en LPG son más susceptibles a los híbridos cecropina A-melitina (Díaz-Achirica *et al.*, 1996). Al ocupar únicamente un 40% de la superficie del promastigote en *Leishmania donovani* (Turco *et al.*, 1987), es una barrera relativa, y que puede actuar de manera dual, ya que puede concentrar PAEs catiónicos cercanos a la membrana.

ii) Degradación proteolítica.

La abundancia en residuos básicos en la mayoría de los péptidos los hace especialmente susceptibles a la degradación por proteinasas tipo tripsina; sin embargo, las características del mecanismo de acción de los PAEs determinan que la degradación sea un factor más, no necesariamente decisivo en la resistencia a los péptidos. Bajo un contexto fisiológico, las concentraciones locales de los péptidos alcanzan niveles micromolares, y en muchos casos la degradación de los PAEs compite con la de otras proteínas. Los casos extremos serían la realizada en el suero con una concentración muy elevada de proteínas y en el otro, los ambientes altamente proteolíticos donde se desenvuelve el ciclo de *Leishmania*, el tubo digestivo del flebotomo o el ambiente del fagosoma del macrófago infectado por ésta, a pesar de la restricción de fusión del lisosoma con el mismo ejercida por *Leishmania*, así como la restricción de acceso de PAEs externos al hábitat del parásito.

En ciertas bacterias Gram-negativas como *E. coli*, *Yersinia pestis* y *S. enterica* la expresión de omptinas, familia de proteasas de membrana externa, protege parcialmente frente a la acción de PAEs, con una especificidad de corte preferentemente entre residuos básicos (Hwang *et al.*, 2007). Sin embargo, no se ha detectado miembros de esta familia en el genoma de *A. baumannii*.

Por el contrario, uno de los mecanismos principales por los que los Gram-positivos adquieren resistencia a PAs consiste en la expresión de diferentes tipos de proteasas (Ouhara *et al.*, 2008), *Staphylococcus epidermidis* expresa la metaloproteasa SepA que degrada la dermicidina (Lai *et al.*, 2007) *Bacillus spp.* degradan LL-37 también

Discusión general

mediante expresión de metaloproteasas (Thwaite *et al.*, 2006) y *S. aureus* expresa las proteasas aureolisina y v8 implicadas en la inactivación de LL-37, cuya expresión es mayor en cepas SARM (Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004). La pérdida de actividad observada para los aislados de comunidad de *S. aureus* probablemente sea debido a la suma de un doble efecto, expresión de estas proteasas más la modificación de los ALTs descrita anteriormente. En el caso de los híbridos cecropina A-melitina la pérdida de actividad es menor debido a que las secuencias de corte para estas enzimas no están presentes, Arg-Leu, Leu-Val y Glu para aureolisina y v8, respectivamente. En lo referente al modelo eucariota, la proteasa mayoritaria de *Leishmania* es la glicoproteína Gp63 o leishmanolisina, se trata de una endoproteasa que escinde preferentemente entre un residuo hidrofóbico y uno básico (Bouvier *et al.*, 1990) y se ha asociado con la resistencia a PAs en *Leishmania*. La trimetilación de lisinas de CA(1-7)M(2-9) implica una mayor estabilidad a proteasas que supone aumento del tiempo de vida media en presencia de fluidos biológicos, y menor sensibilidad a la acción de proteasas del patógeno mejorando las propiedades quimioterapéuticas del péptido.

iii) Interacción con la membrana interna.

Tras superar las barreras externas a la membrana externa, y a la acción de las proteasas, los PAs interaccionarán con la membrana plasmática del patógeno. Dicha interacción estará condicionada tanto por la composición de fosfolípidos de la misma como por las características propias de cada péptido. Todos los péptidos estudiados en la presente tesis ejercen su acción letal mediante permeabilización de la membrana plasmática, sin embargo existen ciertas diferencias según el péptido y el patógeno del que se trate. En gran medida la interacción va a depender de: i) El tipo y al forma del fosfolípido, la inserción de PAs en membranas con fosfolípidos aniónicos con cabezas polares de gran tamaño como PS, inducen curvatura positiva de la misma, favoreciendo la formación de poros toroidales, mientras que cabezas polares de menor tamaño, como PG, promueven curvatura negativa, que requiere de una estequiometría de péptido mayor para la formación del poro (Matsuzaki, 2009). ii) Tamaño y grado de insaturación del ácido graso, factor que además de afectar a la fluidez de membrana, influye en la capacidad de inserción del PA. Como norma general, a mayor tamaño de la cadena, la perturbación por el péptido será menor y por el contrario, membranas con alto porcentaje de ácidos grasos insaturados, por tanto con mayor fluidez, son más permeables a PAs (Matsuzaki, 2009). iii) Presencia de esteroides, éstos causan rigidez de membrana, dificultando la inserción del PA. Los procariotas carecen de esteroides

Discusión general

en su membrana plasmática, lo que explicaría la mayor permeabilización por PAs respecto a eucariotas superiores, y en el caso de *Leishmania* la presencia de ergosterol es menos protectora que la de colesterol (Rivas *et al.*, 2009).

Se ha descrito que la interacción de PAEs con la membrana promueve la formación de dominios, con segregación de fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos, facilitando la inserción del péptido y formación del poro (Erand *et al.*, 2008). Los principales fosfolípidos que componen la membrana de las Gram-positivas son PG y CL, mientras que las Gram-negativas contienen además de estos un alto porcentaje de PE (véase tabla I. 1), la formación de dichos dominios se ve por tanto favorecida en estas últimas (Erand y Erand, 2009), pudiendo explicar la mayor susceptibilidad de *A. baumannii* respecto a *S. aureus* a los híbridos cecropina A-melitina.

Los resultados obtenidos para el modelo Gram positivo para las cepas aisladas de comunidad podrían deberse a que el conjunto de cepas SARM y cepas VISA ensayadas, han tenido que sobrevivir previamente tanto a los péptidos antibióticos de la piel, como a los denominados péptidos modulina solubles (PMS), producidos por las propias bacterias, con una gran semejanza con los PAs (Li *et al.*, 2009), y cuyos niveles de expresión son muy superiores en cepas comunitarias frente a hospitalarias (Wang *et al.*, 2007). Tal y como era esperado la exposición previa a PAs del hospedador y a los PMS implicó menor susceptibilidad de las cepas aisladas de comunidad frente a nuestros péptidos, siendo esta especialmente significativa en el caso de LL-37. Resultados que corresponden con datos previos aportados por la literatura, donde la exposición previa a hBD-3 disminuye la susceptibilidad a otros PAs, por inducir la expresión de los genes *dltB*, *vraF* y *mprF*, responsables de los tres mecanismos principales por los que las bacterias Gram-positivas adquieren resistencia a PAs (Li *et al.*, 2007b), siendo de especial importancia *mprF* al cambiar la carga de los fosfolípidos. En cualquier caso los péptidos cecropina A-melitina son consistentemente menos activos en *S. aureus*, independientemente de su origen clínico. Es importante reseñar que las gramicidinas, a pesar de su menor carga positiva son más activas que los péptidos híbridos cecropina A-melitina.

La composición de fosfolípidos en *Leishmania* es mucho más compleja que la de los procariotas Gram-positivos (tabla I.1). Los resultados de actividad obtenidos han demostrado que los péptidos híbridos cecropina A-melitina permeabilizan su membrana plasmática de forma dependiente de la concentración, mecanismo inmediato tras la adición del péptido, lo que supone la formación de poros de estequiometría definida, como sucede con la mayoría de PAs α -helicoidales (Chan *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso de los péptidos cíclicos Gramicidina S y análogos, se observa una permeabilización de membrana más lenta y que no alcanza el 100% a

Discusión general

las concentraciones letales. La muerte del patógeno en este caso podría explicarse por perturbaciones menores de la membrana, suficientes para despolarizarlo y posteriormente desencadenar un proceso lítico, ya descrito para GS en diferentes tipos de membranas modelo (Ashrafuzzaman *et al.*, 2008). Los ensayos de microscopía electrónica realizados con estas dos familias de péptidos han mostrado un comportamiento similar para ambos en *Leishmania*, con aparición de dos poblaciones tras 4h de incubación, una con morfología inalterada junto con otra más dañada, lo que demuestra un efecto “todo o nada” de los mismos, observado anteriormente para otros péptidos en *Leishmania* (Guerrero *et al.*, 2004) y en membranas artificiales. Los procesos de endo- y exocitosis en *Leishmania* se encuentran restringidos a la región del bolsillo flagelar, única área desprovista de microtúbulos (Morgan *et al.*, 2002), dificultando los mecanismos de reparación de membrana. A pesar de la ausencia de proteinasas de membrana y un glicocálix tan desarrollado como el promastigote, el amastigote es menos susceptible a la acción de los péptidos, que apunta hacia una diferente composición de fosfolípidos de la membrana plasmática, hasta ahora desconocida.

A lo largo de este trabajo se ha expuesto la necesidad del desarrollo de nuevos antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones producidas por tres tipos de patógenos diferentes, que poseen como característica común una rápida adquisición de resistencia frente a los fármacos actualmente empleados para su tratamiento. Como alternativa se ha propuesto la utilización de PAs activos en membrana, a pesar de que la inducción de resistencias frente a los mismos es posible (Adams *et al.*, 2009; Orlova *et al.*, 2007) existen múltiples argumentos que apoyan que es un proceso de difícil consecución para el patógeno; i) Los PAs en general son microbicidas y no microbiostáticos, es decir su CMI es generalmente idéntica a la CMB (EC y LD en el caso de *Leishmania*), y ejercen su acción su acción letal en minutos. ii) Existen PAs, como la nisina, que han sido utilizados desde décadas como conservantes alimentarios sin inducción de resistencias (Galvez *et al.*, 2007). iii). A pesar de que el mecanismo letal de permeabilización de membrana plasmática sea muy similar entre PAs, existe una “firma propia” específica para cada interacción péptido-patógeno (Yang *et al.*, 2007). Dicha especificidad juega en contra de las resistencias cruzadas, tal y como se ha demostrado en el caso de la cepa de *A. baumannii* resistente a colistina y los péptidos híbridos cecropina A-melitina. Así mismo, los otros dos modelos de patógenos estudiados en este trabajo se han tenido que enfrentar previamente a la exposición de PAs, tanto del propio hospedador como del tubo digestivo del flebotomo en el caso de *Leishmania* (Boulanger *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2006), así como *S. aureus* a los del hospedador y a los péptidos endógenos PMS (Li

Discusión general

et al., 2009). Los PAs estudiados en la presente tesis han preservado su actividad frente a todos ellos, sin embargo se ha observado una menor susceptibilidad cuando se han comparado con cepas que no han estado en contacto previo con PAs. Una forma de evitar la aparición de resistencias en el posible uso de los mismos en clínica, sería su utilización en combinación con otros antibióticos clásicos, por ejemplo datos previos de la literatura han demostrado sinergia de CA(1-7)M(2-9) con imipenem y amoxicilina-clavulánico en *S. aureus* (Giacometti *et al.*, 2004). iv) La aparición de PAEs en la evolución, es muy anterior a la inmunidad antígeno específica. Su presencia en seres pluricelulares, así como su eficacia se ha mantenido en la evolución, así la expresión deficiente de determinados PAEs se asocia con una mayor susceptibilidad a las infecciones (Rieg *et al.*, 2005) y viceversa, existe mayor protección frente a éstas por sobre-expresión de PAEs (Cheung *et al.*, 2008). v) Finalmente, en vertebrados es poco frecuente que un único péptido actúe en solitario, en general, en una misma localización coexisten varios péptidos con actividad y características parecidas, pero no iguales. El resultado final es un efecto sinérgico (Nishida *et al.*, 2007), con reducción de la probabilidad de desarrollo de aislados resistentes a un PAE exclusivo, lo que avala la posibilidad de combinación de PAEs como estrategia quimioterapéutica.

5.4. Las técnicas ómicas en la búsqueda de nuevas dianas quimioterapéuticas y en la solución de resistencias.

El gran desarrollo técnico en nanotecnología y bioinformática ha determinado una edad de oro en las técnicas analíticas a gran escala en el análisis de procesos o sucesos biológicos. Después de su desarrollo, en gran manera independiente unas de otras, actualmente coalescen en la denominada biología de sistemas que aborda de una manera global el tema.

En el presente trabajo se ha empleado la proteómica como técnica de elucidación de los mecanismos alternativos desarrollados por *A. baumannii* para sobrevivir a la acción letal de colistina. Los datos obtenidos apuntan hacia terapias de combinación o alternativas que impidan al patógeno sobrevivir una vez que ha desarrollado resistencia. La elección de colistina, que indudablemente elimina el patógeno mediante un fenómeno multifactorial, demuestra la utilidad de la técnica, en este caso utilizada como prueba de principio, al aplicar una aproximación minimalista de laboratorio y no real, como sería la aplicación a cepas clínicas, donde previamente han desarrollado mecanismos de resistencia para otros antibiótico, y que posiblemente han desarrollado modificación metabólicas, algunas de las cuales pueden sinergizar o antagonizar con

Discusión general

las desarrolladas para la colistina. Sin embargo su utilidad disminuye cuando los sistemas de resistencia juegan con los mecanismos de acumulación y de entrada, por ejemplo como ocurre en *Leishmania* con la resistencia a miltefosina (Ouellette *et al.*, 2004) Otro problema existente en *Leishmania* es el fuerte control postranscripcional, comparada con el comportamiento de ARNm bacteriano; lo que determina que los microarrays de ADN no tengan la misma utilidad en *Leishmania* como en otros sistemas. Finalmente, la metabolómica, que analiza los productos finales, sin necesitar conocimiento previo de los niveles de expresión de las proteínas, puede suponer la técnica del futuro cercano.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La ϵ -NH₂ trimetilación de lisina en CA(1-7)M(2-9) permite la modulación de la actividad y selectividad biológica del péptido, mediante dos factores principales, su topología dentro de la secuencia y el número de residuos sustituidos.

2. Dicha variación incrementa el índice terapéutico del péptido parental, esencialmente por disminución de la citotoxicidad. La variación estructural causada al péptido y su menor susceptibilidad a proteasas son los factores subyacentes principales que antagonizan dos de los mayores obstáculos en la utilización de los PAEs como fármacos; citotoxicidad e inestabilidad.

3. La sustitución en la gramicidina S de los dos residuos de fenilalanina del giro β por sus diferentes análogos ha demostrado una potencialidad en la modulación de la actividad del péptido inesperada, considerando su fuerte restricción conformacional. Dicha sustitución ha logrado en el mejor de los casos incremento del índice terapéutico de hasta 5 veces, y en todos los casos, el péptido resultante mantiene constantes dos de sus características esenciales para su actividad microbica, su carga positiva y existencia de hoja β .

5. La base molecular de dicha mejora para el análogo Tic, que posee el mejor índice terapéutico ha evidenciado la importancia de las interacciones entre residuos contiguos de GS, añadiendo una potencialidad de modulación antes supeditada a la formación de enlaces de hidrógenos entre los residuos de las hebras β antiparalelas.

6. La resistencia a PAEs naturales, como el LL-37, demostrada por aislados de *S. aureus* de comunidad es superada por los péptidos híbridos cecropina A-melitina, independientemente de la expresión o no de la toxina LPV. Dicho resultado fundamenta la posible utilización de los mismos frente a dichos aislados, caracterizados por su alta virulencia y adaptación de su membrana a agentes membrano-activos intrínsecos, con alta similitud a PAEs.

7. La resistencia a colistina en *A. baumannii* cursa con pérdida de *fitness* en ausencia de presión de antibiótico, lo que explicaría la baja diseminación de dichas resistencias en comparación con la rápida extensión de resistencias a otros antibióticos.

Conclusiones

8. Los resultados obtenidos mediante 2D-DIGE proporcionan una importante información acerca de los mecanismos de adaptación por los que la bacteria adquiere resistencia a colistina, y que de poder ser extrapolados al ámbito clínico, señalarían dianas cuya inhibición causaría la destrucción de la reprogramación metabólica inherente a la resistencia a colistina.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Abraham, T., Marwaha, S., Kobewka, D.M., Lewis, R.N., Prenner, E.J., Hodges, R.S., McElhaney, R.N., 2007, The relationship between the binding to and permeabilization of phospholipid bilayer membranes by GS14dK4, a designed analog of the antimicrobial peptide gramicidin S. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 2089-2098.
- Abrunhosa, F., Faria, S., Gomes, P., Tomaz, I., Pessoa, J.C., Andreu, D., Bastos, M., 2005, Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. *The journal of physical chemistry* 109, 17311-17319.
- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Crosa, L.M., Crosa, J.H., 1993, Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of clinical microbiology* 31, 2812-2815.
- Achterberg, V., Gercken, G., 1987, Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and biochemical parasitology* 23, 117-122.
- Adams, M.D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K.M., Lavender, H., Jamison, J.J., MacDonald, I.J., Martin, K.M., Russo, T., Campagnari, A.A., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Gill, S.R., 2008, Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology* 190, 8053-8064.
- Adams, M.D., Nickel, G.C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A.R., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., 2009, Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 3628-3634.
- Adinolfi, L.E., Bonventre, P.F., Vander Pas, M., Eppstein, D.A., 1985, Synergistic effect of glucantime and a liposome-encapsulated muramyl dipeptide analog in therapy of experimental visceral leishmaniasis. *Infection and immunity* 48, 409-416.
- Afonin, S., Glaser, R.W., Berditchevskaia, M., Wadhwani, P., Guhrs, K.H., Mollmann, U., Perner, A., Ulrich, A.S., 2003, 4-fluorophenylglycine as a label for 19F NMR structure analysis of membrane-associated peptides. *ChemBiochem* 4, 1151-1163.
- Aksoy, D.Y., Unal, S., 2008, New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 14, 411-420.
- Al-Mutairi, N., Al-Doukhi, A., Al-Farag, S., Al-Haddad, A., 2009, Comparative Study on the Efficacy, Safety, and Acceptability of Imiquimod 5% Cream versus Cryotherapy for Molluscum Contagiosum in Children. *Pediatric dermatology*.
- Alarcon, T., Lopez-Hernandez, S., Andreu, D., Saugar, J.M., Rivas, L., Lopez-Brea, M., 2001, In vitro activity of CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide, against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Rev Esp Quimioter* 14, 184-190.
- Alberola, J., Rodriguez, A., Francino, O., Roura, X., Rivas, L., Andreu, D., 2004, Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 641-643.
- Alexander, B., Maroli, M., 2003, Control of phlebotomine sandflies. *Medical and veterinary entomology* 17, 1-18.
- Alibaud, L., Kohler, T., Coudray, A., Prigent-Combaret, C., Bergeret, E., Perrin, J., Benghezal, M., Reimann, C., Gauthier, Y., van Delden, C., Attree, I.,

Bibliografía

- Fauvarque, M.O., Cosson, P., 2008, *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes identified in a *Dictyostelium* host model. Cellular microbiology 10, 729-740.
- Alonso, A., Morales, G., Escalante, R., Campanario, E., Sastre, L., Martinez, J.L., 2004, Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. The Journal of antimicrobial chemotherapy 53, 432-434.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R., Moreno, J., 2008, The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clinical microbiology reviews 21, 334-359, table of contents.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004, Canine leishmaniasis. Advances in parasitology 57, 1-88.
- Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P., 2006a, Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. Advances in parasitology 61, 223-274.
- Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C., 2006b, Leishmaniasis and poverty. Trends in parasitology 22, 552-557.
- Alvarez, C., Mancheno, J.M., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, F., Lanio, M.E., 2009, Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. Toxicon 54, 1135-1147.
- Andersson, D.I., 2006, The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Current opinion in microbiology 9, 461-465.
- Ando, S., Nishikawa, H., Takiguchi, H., Lee, S., Sugihara, G., 1993, Antimicrobial specificity and hemolytic activity of cyclized basic amphiphilic beta-structural model peptides and their interactions with phospholipid bilayers. Biochimica et biophysica acta 1147, 42-49.
- Andreu, D., Merrifield, R.B., Steiner, H., Boman, H.G., 1985, N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. Biochemistry 24, 1683-1688.
- Andreu, D., Ubach, J., Boman, A., Wahlin, B., Wade, D., Merrifield, R.B., Boman, H.G., 1992, Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. FEBS letters 296, 190-194.
- Antoine, J.C., Prina, E., Courret, N., Lang, T., 2004, *Leishmania spp.*: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. Advances in parasitology 58, 1-68.
- Appelbaum, P.C., 2006, The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 12 Suppl 1, 16-23.
- Ardic, N., Ozyurt, M., Sareyyupoglu, B., Haznedaroglu, T., 2005, Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. International journal of antimicrobial agents 26, 213-218.
- Ashrafuzzaman, M., Andersen, O.S., McElhaney, R.N., 2008, The antimicrobial peptide gramicidin S permeabilizes phospholipid bilayer membranes without forming discrete ion channels. Biochimica et biophysica acta 1778, 2814-2822.
- Aubry-Damon, H., Soussy, C.J., Courvalin, P., 1998, Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy 42, 2590-2594.
- Avila, J.L., Biondo, F., Monzon, H., Convit, J., 1982, Cutaneous leishmaniasis in mice: resistance to glucan immunotherapy, either alone or combined with chemotherapy. The American journal of tropical medicine and hygiene 31, 53-59.

Bibliografia

- Bach, A.C., 2nd, Markwalder, J.A., Ripka, W.C., 1991, Synthesis and NMR conformational analysis of a beta-turn mimic incorporated into gramicidin S. A general approach to evaluate beta-turn peptidomimetics. *International journal of peptide and protein research* 38, 314-323.
- Bachrach, G., Altman, H., Kolenbrander, P.E., Chalmers, N.I., Gabai-Gutner, M., Mor, A., Friedman, M., Steinberg, D., 2008, Resistance of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 to direct killing by antimicrobial peptides is protease independent. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 638-642.
- Bader, M.W., Navarre, W.W., Shiau, W., Nikaido, H., Frye, J.G., McClelland, M., Fang, F.C., Miller, S.I., 2003, Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Molecular microbiology* 50, 219-230.
- Balaban, N., Gov, Y., Giacometti, A., Cirioni, O., Ghiselli, R., Mocchegiani, F., Orlando, F., D'Amato, G., Saba, V., Scalise, G., Bernes, S., Mor, A., 2004, A chimeric peptide composed of a dermaseptin derivative and an RNA III-inhibiting peptide prevents graft-associated infections by antibiotic-resistant staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2544-2550.
- Banuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007, Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology* 64, 1-109.
- Barber, M., Mainprize, J.V., 1947, The waning power of penicillin. *British medical journal* 2, 1053.
- Barrow, K., Kwon, D.H., 2009, Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 5150-5154.
- Bastos, M., Bai, G., Gomes, P., Andreu, D., Goormaghtigh, E., Prieto, M., 2008, Energetics and partition of two cecropin-melittin hybrid peptides to model membranes of different composition. *Biophysical journal* 94, 2128-2141.
- Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R.Y., 1968, A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 95, 1520-1541.
- Beck-Sague, C.M., Jarvis, W.R., Brook, J.H., Culver, D.H., Potts, A., Gay, E., Shotts, B.W., Hill, B., Anderson, R.L., Weinstein, M.P., 1990, Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *American journal of epidemiology* 132, 723-733.
- Beetham, J.K., Myung, K.S., McCoy, J.J., Wilson, M.E., Donelson, J.E., 1997, Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *The Journal of biological chemistry* 272, 17360-17366.
- Benachir, T., Lafleur, M., 1995, Study of vesicle leakage induced by melittin. *Biochimica et biophysica acta* 1235, 452-460.
- Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R., Vaidya, T., 2003, Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and biochemical parasitology* 127, 23-35.
- Bergman, P., Walter-Jallow, L., Broliden, K., Agerberth, B., Soderlund, J., 2007, The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Current HIV research* 5, 410-415.
- Bergogne-Berenzin, E., Friedman, H., Benidelli, M. 2008. *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis. In *Virulence Mechanisms of Acinetobacter* (Springer).

Bibliografia

- Berkestedt, I., Nelson, A., Bodelsson, M., 2008, Endogenous antimicrobial peptide LL-37 induces human vasodilatation. *British journal of anaesthesia* 100, 803-809.
- Bernabeu-Wittel, M., Pichardo, C., Garcia-Curiel, A., Pachon-Ibanez, M.E., Ibanez-Martinez, J., Jimenez-Mejias, M.E., Pachon, J., 2005, Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the in-vivo efficacy of imipenem alone or in combination with amikacin for the treatment of experimental multiresistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 11, 319-325.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Rodriguez-Palenzuela, P., Garcia-Olmedo, F., Rivas, L., 2009, *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Experimental parasitology* 122, 247-249.
- Bhargava, K., Feix, J.B., 2004, Membrane binding, structure, and localization of cecropin-mellitin hybrid peptides: a site-directed spin-labeling study. *Biophysical journal* 86, 329-336.
- Bhattacharya, M., Parakh, A., Narang, M., 2009, Tigecycline. *Journal of postgraduate medicine* 55, 65-68.
- Boman, H.G., Wade, D., Boman, I.A., Wahlin, B., Merrifield, R.B., 1989, Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS letters* 259, 103-106.
- Bonomo, R.A., Szabo, D., 2006, Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2, S49-56.
- Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., Svobodova, M., Beverley, S.M., Spath, G., Brun, R., Pesson, B., Bulet, P., 2004, Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and immunity* 72, 7140-7146.
- Bouvier, J., Schneider, P., Etges, R., Bordier, C., 1990, Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry* 29, 10113-10119.
- Bowdish, D.M., Davidson, D.J., Lau, Y.E., Lee, K., Scott, M.G., Hancock, R.E., 2005, Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of leukocyte biology* 77, 451-459.
- Brachwitz, H., Vollgraf, C., 1995, Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmacology & therapeutics* 66, 39-82.
- Breazeale, S.D., Ribeiro, A.A., McClerren, A.L., Raetz, C.R., 2005, A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *The Journal of biological chemistry* 280, 14154-14167.
- Brisou, J., Prevot, A.R., 1954, Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 86, 722-728.
- Brogden, K.A., 2005, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews* 3, 238-250.
- Buisson, Y., Tran Van Nhieu, G., Ginot, L., Bouvet, P., Schill, H., Driot, L., Meyran, M., 1990, Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant tobramycin-sensitive *Acinetobacter* species: correlation with amikacin usage. *The Journal of hospital infection* 15, 83-93.
- Bulet, P., Stocklin, R., Menin, L., 2004, Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews* 198, 169-184.

Bibliografia

- Burlak, C., Hammer, C.H., Robinson, M.A., Whitney, A.R., McGavin, M.J., Kreiswirth, B.N., Deleo, F.R., 2007, Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. *Cellular microbiology* 9, 1172-1190.
- Burton, M.F., Steel, P.G., 2009, The chemistry and biology of LL-37. *Natural product reports* 26, 1572-1584.
- Cabrera, M., Blackwell, J.M., Castes, M., Trujillo, D., Convit, J., Shaw, M.A., 2000, Immunotherapy with live BCG plus heat killed *Leishmania* induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite immunology* 22, 73-79.
- Cajal, Y., Ghanta, J., Easwaran, K., Surolia, A., Jain, M.K., 1996, Specificity for the exchange of phospholipids through polymyxin B mediated intermembrane molecular contacts. *Biochemistry* 35, 5684-5695.
- Campos, M.A., Vargas, M.A., Regueiro, V., Llompарт, C.M., Alberti, S., Bengoechea, J.A., 2004, Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity* 72, 7107-7114.
- Carter, K.C., Hutchison, S., Henriquez, F.L., Legare, D., Ouellette, M., Roberts, C.W., Mullen, A.B., 2006, Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 88-95.
- Cavalier-Smith, T., 1998, A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73, 203-266.
- Cavallarin, L., Andreu, D., San Segundo, B., 1998, Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 218-227.
- Cevahir, N., Demir, M., Kaleli, I., Gurbuz, M., Tikvesli, S., 2008, Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 41, 513-518.
- Cillari, E., Arcoleo, F., Dieli, M., D'Agostino, R., Gromo, G., Leoni, F., Milano, S., 1994, The macrophage-activating tetrapeptide tuftsin induces nitric oxide synthesis and stimulates murine macrophages to kill *Leishmania* parasites in vitro. *Infection and immunity* 62, 2649-2652.
- Cisneros, J.M., Rodriguez-Bano, J., 2002, Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 8, 687-693.
- Clarek, T.B., Wallace, F.G., 1960, A comparative study of kinetoplast ultrastructure in the trypanosomatidae. *The Journal of protozoology* 7, 115-124.
- CLSI, C.a.L.S.I., 2005.
- Colmenares, M., Corbi, A.L., Turco, S.J., Rivas, L., 2004, The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol* 172, 1186-1190.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O.M., Corbi, A.L., Rivas, L., 2002, Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *The Journal of biological chemistry* 277, 36766-36769.
- Corbella, X., Ariza, J., Ardanuy, C., Vuelta, M., Tubau, F., Sora, M., Pujol, M., Gudiol, F., 1998, Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *The*

Bibliografia

- Journal of antimicrobial chemotherapy 42, 793-802.
- Courret, N., Frehel, C., Prina, E., Lang, T., Antoine, J.C., 2001, Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitology* 122, 263-279.
- Craik, D.J., Cemazar, M., Wang, C.K., Daly, N.L., 2006, The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Biopolymers* 84, 250-266.
- Croft, S.L., Neal, R.A., Pendergast, W., Chan, J.H., 1987, The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical pharmacology* 36, 2633-2636.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H., 2006, Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews* 19, 111-126.
- Croft, S.L., Yardley, V., 2002, Chemotherapy of leishmaniasis. *Current pharmaceutical design* 8, 319-342.
- Crossley, K., Loesch, D., Landesman, B., Mead, K., Chern, M., Strate, R., 1979, An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. I. Clinical studies. *The Journal of infectious diseases* 139, 273-279.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavate, C., Desjeux, P., Alvar, J., 2006, Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *The Indian journal of medical research* 123, 357-388.
- Culver, G.M., Noller, H.F., 1999, Efficient reconstitution of functional *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from a complete set of recombinant small subunit ribosomal proteins. *RNA (New York, N.Y.)* 5, 832-843.
- Chambers, H.F., Deleo, F.R., 2009, Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews* 7, 629-641.
- Chan, D.I., Prenner, E.J., Vogel, H.J., 2006, Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta* 1758, 1184-1202.
- Chang, C.I., Zhang, Y.A., Zou, J., Nie, P., Secombes, C.J., 2006, Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 185-195.
- Chen, D.Q., Kolli, B.K., Yadava, N., Lu, H.G., Gilman-Sachs, A., Peterson, D.A., Chang, K.P., 2000, Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infection and immunity* 68, 80-86.
- Cheung, Q.C., Turner, P.V., Song, C., Wu, D., Cai, H.Y., MacInnes, J.I., Li, J., 2008, Enhanced resistance to bacterial infection in protegrin-1 transgenic mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 1812-1819.
- Chicharro, C., Granata, C., Lozano, R., Andreu, D., Rivas, L., 2001, N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 2441-2449.
- Choi, K.M., Atkins, J.F., Gesteland, R.F., Brimacombe, R., 1998, Flexibility of the nascent polypeptide chain within the ribosome--contacts from the peptide N-terminus to a specific region of the 30S subunit. *European journal of biochemistry / FEBS* 255, 409-413.
- Chongsiriwatana, N.P., Patch, J.A., Czyzewski, A.M., Dohm, M.T., Ivankin, A., Gidalevitz, D., Zuckermann, R.N., Barron, A.E., 2008, Peptoids that mimic the

Bibliografia

- structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2794-2799.
- Daniel, J.A., Pray-Grant, M.G., Grant, P.A., 2005, Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 4, 919-926.
- Dantas-Torres, F., 2006, Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary parasitology* 141, 1-8.
- Daugelavicius, R., Bakiene, E., Bamford, D.H., 2000, Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 2969-2978.
- David, M.D., Gill, M.J., 2008, Potential for underdosing and emergence of resistance in *Acinetobacter baumannii* during treatment with colistin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 61, 962-964.
- de Kruijff, B., van Dam, V., Breukink, E., 2008, Lipid II: a central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 79, 117-121.
- DeGrado, W.F., Musso, G.F., Lieber, M., Kaiser, E.T., Kezdy, F.J., 1982, Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. *Biophysical journal* 37, 329-338.
- del Mar Tomas, M., Beceiro, A., Perez, A., Velasco, D., Moure, R., Villanueva, R., Martinez-Beltran, J., Bou, G., 2005, Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 5172-5175.
- Dempsey, C.E., Cryer, G.D., Watts, A., 1987, The interaction of amino-deuteromethylated melittin with phospholipid membranes studied by deuterium NMR. *FEBS letters* 218, 173-177.
- den Hertog, A.L., van Marle, J., van Veen, H.A., Van't Hof, W., Bolscher, J.G., Veerman, E.C., Nieuw Amerongen, A.V., 2005, Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *The Biochemical journal* 388, 689-695.
- Descoteaux, A., Turco, S.J., 1999, Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et biophysica acta* 1455, 341-352.
- Diaz-Achirica, P., Prieto, S., Ubach, J., Andreu, D., Rial, E., Rivas, L., 1994, Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin-A-melittin hybrid peptides. *European journal of biochemistry / FEBS* 224, 257-263.
- Diaz-Achirica, P., Ubach, J., Guinea, A., Andreu, D., Rivas, L., 1998, The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide. *The Biochemical journal* 330 (Pt 1), 453-460.
- Diaz-Achirica, P., Ubach, J., Guinea, A., Rivas, A., 1996, Mechanism of action of cecropin A-melittin hybrid peptides on *Leishmania sp.* parasites. *American Peptide Symposium. Peptides: Chemistry, Structure and Biology* 14, 183-185.
- Diep, B.A., Chan, L., Tattavin, P., Kajikawa, O., Martin, T.R., Basuino, L., Mai, T.T., Marbach, H., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Gardner, D.J., Fan, X., Tseng, C.W., Liu, G.Y., Badiou, C., Etienne, J., Lina, G., Matthay, M.A., DeLeo, F.R., Chambers, H.F., 2010, Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus*

Bibliografia

- aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 5587-5592.
- Diep, B.A., Otto, M., 2008, The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends in microbiology 16, 361-369.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical microbiology reviews 13, 16-34, table of contents.
- Dinulos, J.G., Mentele, L., Fredericks, L.P., Dale, B.A., Darmstadt, G.L., 2003, Keratinocyte expression of human beta defensin 2 following bacterial infection: role in cutaneous host defense. Clinical and diagnostic laboratory immunology 10, 161-166.
- Dubos, R.J., Hotchkiss, R.D., 1941, The Production of Bactericidal Substances by Aerobic Sporulating Bacilli. The Journal of experimental medicine 73, 629-640.
- Duenas-Romero, A.M., Loiseau, P.M., Saint-Pierre-Chazalet, M., 2007, Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. Biochimica et biophysica acta 1768, 246-252.
- Dupont, M., Pages, J.M., Lafitte, D., Siroy, A., Bollet, C., 2005, Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. Journal of proteome research 4, 2386-2390.
- Durell, S.R., Raghunathan, G., Guy, H.R., 1992, Modeling the ion channel structure of cecropin. Biophysical journal 63, 1623-1631.
- Durr, U.H., Sudheendra, U.S., Ramamoorthy, A., 2006, LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. Biochimica et biophysica acta 1758, 1408-1425.
- Dwyer, D.J., Kohanski, M.A., Hayete, B., Collins, J.J., 2007, Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. Molecular systems biology 3, 91.
- Easton, D.M., Nijnik, A., Mayer, M.L., Hancock, R.E., 2009, Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. Trends in biotechnology 27, 582-590.
- Epand, R.F., Savage, P.B., Epand, R.M., 2007, Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). Biochimica et biophysica acta 1768, 2500-2509.
- Epand, R.M., Epand, R.F., 2009, Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. Biochimica et biophysica acta 1788, 289-294.
- Epand, R.M., Rotem, S., Mor, A., Berno, B., Epand, R.F., 2008, Bacterial membranes as predictors of antimicrobial potency. Journal of the American Chemical Society 130, 14346-14352.
- Erridge, C., Moncayo-Nieto, O.L., Morgan, R., Young, M., Poxton, I.R., 2007, *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. Journal of medical microbiology 56, 165-171.
- Falagas, M.E., Karveli, E.A., Kelesidis, I., Kelesidis, T., 2007, Community-acquired *Acinetobacter* infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26, 857-868.
- Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., 2005, Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis 40, 1333-1341.
- Felek, S., Muszynski, A., Carlson, R.W., Tsang, T.M., Hinnebusch, B.J., Krukoni, E.S., 2009, Phosphoglucosyltransferase of *Yersinia pestis* is Required for Autoaggregation and Polymyxin B Resistance. Infection and immunity.

Bibliografia

- Fernandes, J.M., Saint, N., Kemp, G.D., Smith, V.J., 2003, Oncorhyncin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *The Biochemical journal* 373, 621-628.
- Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M.C., Ayala, J.A., Perea, E.J., Pascual, A., 2003, Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51, 565-574.
- Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Ribera, A., Vila, J., Bou, G., Cisneros, J.M., Rodriguez-Bano, J., Pachon, J., Martinez-Martinez, L., 2004, [Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000)]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 22, 267-271.
- Fernandez-Reyes, M., Rodriguez-Falcon, M., Chiva, C., Pachon, J., Andreu, D., Rivas, L., 2009, The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective. *Proteomics* 9, 1632-1645.
- Fernandez, I., Ubach, J., Reig, F., Andreu, D., Pons, M., 1994, Effect of succinylation on the membrane activity and conformation of a short cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biopolymers* 34, 1251-1258.
- Ferre, R., Badosa, E., Feliu, L., Planas, M., Montesinos, E., Bardaji, E., 2006, Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Applied and environmental microbiology* 72, 3302-3308.
- Ferre, R., Melo, M.N., Correia, A.D., Feliu, L., Bardaji, E., Planas, M., Castanho, M., 2009, Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100. *Biophysical journal* 96, 1815-1827.
- Fischer, W., 1988, Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Advances in microbial physiology* 29, 233-302.
- Folgueira, C., Martinez-Bonet, M., Requena, J.M., The *Leishmania infantum* PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis. *BMC research notes* 3, 13.
- Fournier, B., Philpott, D.J., 2005, Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clinical microbiology reviews* 18, 521-540.
- Franceschi, F.J., Nierhaus, K.H., 1990, Ribosomal proteins L15 and L16 are mere late assembly proteins of the large ribosomal subunit. Analysis of an *Escherichia coli* mutant lacking L15. *The Journal of biological chemistry* 265, 16676-16682.
- Fraser, J.D., Proft, T., 2008, The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological reviews* 225, 226-243.
- Fridkin, S.K., Hageman, J.C., Morrison, M., Sanza, L.T., Como-Sabetti, K., Jernigan, J.A., Harriman, K., Harrison, L.H., Lynfield, R., Farley, M.M., 2005, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *The New England journal of medicine* 352, 1436-1444.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N., 2007, Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology* 120, 51-70.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., Lehrer, R.I., 1985, Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 76, 1427-1435.
- Gao, R., Stock, A.M., 2009, Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology* 63, 133-154.

Bibliografia

- Garcia-Lara, J., Foster, S.J., 2009, Anti-*Staphylococcus aureus* immunotherapy: current status and prospects. *Current opinion in pharmacology* 9, 552-557.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodriguez-Palenzuela, P., 1998, Plant defense peptides. *Biopolymers* 47, 479-491.
- Garcia, A., Salgado, F., Solar, H., Gonzalez, C.L., Zemelman, R., Onate, A., 1999, Some immunological properties of lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of medical microbiology* 48, 479-483.
- Garnacho-Montero, J., Ortiz-Leyba, C., Jimenez-Jimenez, F.J., Barrero-Almodovar, A.E., Garcia-Garmendia, J.L., Bernabeu-Wittel, I.M., Gallego-Lara, S.L., Madrazo-Osuna, J., 2003, Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis* 36, 1111-1118.
- Gause, G.F., Brazhnikova, M.G., 1944, *Nature* 154, 703.
- Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., 1993, *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Apmis* 101, 826-832.
- Ghose, A.C., Mookerjee, A., Sengupta, K., Ghosh, A.K., Dasgupta, S., Ray, P.K., 1999, Therapeutic and prophylactic uses of protein A in the control of *Leishmania donovani* infection in experimental animals. *Immunology letters* 65, 175-181.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Kamysz, W., D'Amato, G., Silvestri, C., Del Prete, M.S., Lukasiak, J., Scalise, G., 2003, Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 24, 1315-1318.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Kamysz, W., D'Amato, G., Silvestri, C., Simona Del Prete, M., Lukasiak, J., Scalise, G., 2004, In vitro activity and killing effect of the synthetic hybrid cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ on methicillin-resistant nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 49, 197-200.
- Gibbs, A.C., Bjorndahl, T.C., Hodges, R.S., Wishart, D.S., 2002, Probing the structural determinants of type II' beta-turn formation in peptides and proteins. *Journal of the American Chemical Society* 124, 1203-1213.
- Giuliani, A., Pirri, G., Bozzi, A., Di Giulio, A., Aschi, M., Rinaldi, A.C., 2008, Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol Life Sci* 65, 2450-2460.
- Goel, V.K., Kapil, A., 2001, Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane Proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC microbiology* 1, 16.
- Goldstein, F.W., Labigne-Roussel, A., Gerbaud, G., Carlier, C., Collatz, E., Courvalin, P., 1983, Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid* 10, 138-147.
- Gombac, F., Riccio, M.L., Rossolini, G.M., Lagatolla, C., Tonin, E., Monti-Bragadin, C., Lavenia, A., Dolzani, L., 2002, Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 3665-3668.
- Gooderham, W.J., Bains, M., McPhee, J.B., Wiegand, I., Hancock, R.E., 2008, Induction by cationic antimicrobial peptides and involvement in intrinsic polymyxin and antimicrobial peptide resistance, biofilm formation, and swarming motility of PsrA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*

Bibliografia

- 190, 5624-5634.
- Gregory, D.J., Olivier, M., 2005, Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology* 130 Suppl, S27-35.
- Gregory, S.M., Cavanaugh, A., Journigan, V., Pokorny, A., Almeida, P.F., 2008, A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. *Biophysical journal* 94, 1667-1680.
- Gribun, A., Nitzan, Y., Pechatnikov, I., Hershkovits, G., Katcoff, D.J., 2003, Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Current microbiology* 47, 434-443.
- Grotenbreg, G.M., Buizert, A.E., Llamas-Saiz, A.L., Spalburg, E., van Hooft, P.A., de Neeling, A.J., Noort, D., van Raaij, M.J., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., Overhand, M., 2006, Beta-turn modified gramicidin S analogues containing arylated sugar amino acids display antimicrobial and hemolytic activity comparable to the natural product. *Journal of the American Chemical Society* 128, 7559-7565.
- Grotenbreg, G.M., Spalburg, E., de Neeling, A.J., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., van Boom, J.H., Overhand, M., 2003, Synthesis and biological evaluation of novel turn-modified gramicidin S analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry* 11, 2835-2841.
- Grotenbreg, G.M., Timmer, M.S., Llamas-Saiz, A.L., Verdoes, M., van der Marel, G.A., van Raaij, M.J., Overkleeft, H.S., Overhand, M., 2004, An unusual reverse turn structure adopted by a furanoid sugar amino acid incorporated in gramicidin S. *Journal of the American Chemical Society* 126, 3444-3446.
- Gu, S.Q., Jockel, J., Beinker, P., Warnecke, J., Semenov, Y.P., Rodnina, M.V., Wintermeyer, W., 2005, Conformation of 4.5S RNA in the signal recognition particle and on the 30S ribosomal subunit. *RNA (New York, N.Y)* 11, 1374-1384.
- Guerrero, E., Saugar, J.M., Matsuzaki, K., Rivas, L., 2004, Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2980-2986.
- Guha-Niyogi, A., Sullivan, D.R., Turco, S.J., 2001, Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology* 11, 45R-59R.
- Gunn, J.S., 2008, The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends in microbiology* 16, 284-290.
- Gutsmann, T., Seydel, U., 2010, Impact of the glycostructure of amphiphilic membrane components on the function of the outer membrane of Gram-negative bacteria as a matrix for incorporated channels and a target for antimicrobial peptides or proteins. *European journal of cell biology* 89, 11-23.
- Habermann, E., 1972, Bee and wasp venoms. *Science (New York, N.Y)* 177, 314-322.
- Hamill, P., Brown, K., Jenssen, H., Hancock, R.E., 2008, Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Current opinion in biotechnology* 19, 628-636.
- Hanaki, H., Labischinski, H., Sasaki, K., Kuwahara-Arai, K., Inaba, Y., Hiramatsu, K., 1998, [Mechanism of vancomycin resistance in MRSA strain Mu50]. *The Japanese journal of antibiotics* 51, 237-247.
- Hancock, R.E., Chapple, D.S., 1999, Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 1317-1323.
- Hancock, R.E., Lehrer, R., 1998, Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology* 16, 82-88.

Bibliografia

- Hancock, R.E., Sahl, H.G., 2006, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* 24, 1551-1557.
- Handman, E., 1999, Cell biology of *Leishmania*. *Advances in parasitology* 44, 1-39.
- Handman, E., 2001, Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical microbiology reviews* 14, 229-243.
- Hartman, B.J., Tomasz, A., 1984, Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 158, 513-516.
- Haug, B.E., Strom, M.B., Svendsen, J.S., 2007, The medicinal chemistry of short lactoferricin-based antibacterial peptides. *Current medicinal chemistry* 14, 1-18.
- Henzler-Wildman, K.A., Martinez, G.V., Brown, M.F., Ramamoorthy, A., 2004, Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* 43, 8459-8469.
- Herold, B.C., Immergluck, L.C., Maranan, M.C., Lauderdale, D.S., Gaskin, R.E., Boyle-Vavra, S., Leitch, C.D., Daum, R.S., 1998, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *Jama* 279, 593-598.
- Heuck, A.P., Moe, P.C., Johnson, B.B., 2010, The cholesterol-dependent cytolysis family of gram-positive bacterial toxins. *Sub-cellular biochemistry* 51, 551-577.
- Holak, T.A., Engstrom, A., Kraulis, P.J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T.A., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., 1988, The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 27, 7620-7629.
- Hong, H.J., Hutchings, M.I., Buttner, M.J., 2008, Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Advances in experimental medicine and biology* 631, 200-213.
- Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2005, Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International journal of antimicrobial agents* 25, 358-373.
- Hu, D.L., Omoe, K., Sasaki, S., Sashinami, H., Sakuraba, H., Yokomizo, Y., Shinagawa, K., Nakane, A., 2003, Vaccination with nontoxic mutant toxic shock syndrome toxin 1 protects against *Staphylococcus aureus* infection. *The Journal of infectious diseases* 188, 743-752.
- Hull, S.E., Karlsson, R., Main, P., Woolfson, M.M., Dodson, E., 1978, *Nature* 275, 206-207.
- Huys, G., Cnockaert, M., Vaneechoutte, M., Woodford, N., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Swings, J., 2005, Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Research in microbiology* 156, 348-355.
- Hwang, B.Y., Varadarajan, N., Li, H., Rodriguez, S., Iverson, B.L., Georgiou, G., 2007, Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpP. *Journal of bacteriology* 189, 522-530.
- Ikeda, Y., Young, L.H., Scalia, R., Ross, C.R., Lefer, A.M., 2001, PR-39, a proline/arginine-rich antimicrobial peptide, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovascular research* 49, 69-77.
- Ilg, T., Harbecke, D., Overath, P., 1993, The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS letters* 327, 103-107.

Bibliografia

- Ito, K., Cerretti, D.P., Nashimoto, H., Nomura, M., 1984, Characterization of an amber mutation in the structural gene for ribosomal protein L15, which impairs the expression of the protein export gene, secY, in *Escherichia coli*. The EMBO journal 3, 2319-2324.
- Izumiya, N., Kato, T., Aoyagi, H., Waki, M., Kondo, M., 1979, Synthetic Aspects of Biologically Active Cyclic Peptides: Gramicidin S and Tyrocidines. (Wiley) New York.
- Javelle, A., Severi, E., Thornton, J., Merrick, M., 2004, Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. The Journal of biological chemistry 279, 8530-8538.
- Jelokhani-Niaraki, M., Hodges, R.S., Meissner, J.E., Hassenstein, U.E., Wheaton, L., 2008, Interaction of gramicidin S and its aromatic amino-acid analog with phospholipid membranes. Biophysical journal 95, 3306-3321.
- Jelokhani-Niaraki, M., Kondejewski, L.H., Farmer, S.W., Hancock, R.E., Kay, C.M., Hodges, R.S., 2000, Diastereoisomeric analogues of gramicidin S: structure, biological activity and interaction with lipid bilayers. The Biochemical journal 349 Pt 3, 747-755.
- Jelokhani-Niaraki, M., Kondejewski, L.H., Wheaton, L.C., Hodges, R.S., 2009, Effect of ring size on conformation and biological activity of cyclic cationic antimicrobial peptides. Journal of medicinal chemistry 52, 2090-2097.
- Jelokhani-Niaraki, M., Prenner, E.J., Kondejewski, L.H., Kay, C.M., McElhaney, R.N., Hodges, R.S., 2001, Conformation and other biophysical properties of cyclic antimicrobial peptides in aqueous solutions. J Pept Res 58, 293-306.
- Jellema, W.T., Veerman, D.P., De Winter, R.J., Wesseling, K.H., Van Deventer, S.J., Hack, C.E., van Lieshout, J.J., 2002, In vivo interaction of endotoxin and recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI23): hemodynamic effects in a human endotoxemia model. The Journal of laboratory and clinical medicine 140, 228-235.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E., 2006, Peptide antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews 19, 491-511.
- Jevons, M., 1961, "Celbenin"-resistant staphylococci. BMJ 1, 124-125.
- Jevons, M.P., Coe, A.W., Parker, M.T., 1963, Methicillin resistance in staphylococci. Lancet 1, 904-907.
- Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Bachmann, P., Karbwang, J., Fischer, C., Voss, A., Berman, J., 1999, Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. The New England journal of medicine 341, 1795-1800.
- Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Felton, J.M., Sabin, A.J., Horton, J., 2005, A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. The American journal of tropical medicine and hygiene 73, 1005-1011.
- Jimenez-Mejias, M.E., Pichardo-Guerrero, C., Marquez-Rivas, F.J., Martin-Lozano, D., Prados, T., Pachon, J., 2002, Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21, 212-214.
- Joly-Guillou, M.L., 2005, Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 11, 868-873.
- Kaczanowska, M., Ryden-Aulin, M., 2007, Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev 71, 477-494.
- Kamhawi, S., 2006, Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends in parasitology 22, 439-445.

Bibliografia

- Karageorgopoulos, D.E., Falagas, M.E., 2008, Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *The Lancet infectious diseases* 8, 751-762.
- Katsu, T., Kobayashi, H., Fujita, Y., 1986, Mode of action of gramicidin S on *Escherichia coli* membrane. *Biochimica et biophysica acta* 860, 608-619.
- Kawai, M., Ohya, M., Fukuta, N., Butsugan, F., Saito, K., 1991, Preparation, Stereochemistry, and Antibacterial Activity of Gramicidin S Analogs Containing N-Methyl Groups. *The Chemical Society of Japan* 64, 35-41.
- Kawai, M., Tanaka, R., Yamamura, H., Yasuda, K., Narita, S., Umemoto, H., Ando, S., Katsu, T., 2003, Extra amino group-containing gramicidin S analogs possessing outer membrane-permeabilizing activity. *Chemical communications* (Cambridge, England), 1264-1265.
- Kawai, M., Yamamura, H., Tanaka, R., Umemoto, H., Ohmizo, C., Higuchi, S., Katsu, T., 2005, Proline residue-modified polycationic analogs of gramicidin S with high antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and low hemolytic activity. *J Pept Res* 65, 98-104.
- Kawasaki, K., China, K., Nishijima, M., 2007, Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology* 189, 4911-4919.
- Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F., Modabber, F., 2006, Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *The Indian journal of medical research* 123, 423-438.
- Kim H, Eliuk S, Deshane J, Meleth S, Sanderson T, Pinner A, Robinson G, Wilson L, Kirk M, S., B., 2007, 2D gel proteomics: an approach to study age-related differences in protein abundance or isoform complexity in biological samples. *Methods Mol Biol.* 371, 349-391.
- Kima, P.E., 2007, The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International journal for parasitology* 37, 1087-1096.
- Kobayashi, S.D., DeLeo, F.R., 2009, An update on community-associated MRSA virulence. *Current opinion in pharmacology* 9, 545-551.
- Kondejewski, L.H., Farmer, S.W., Wishart, D.S., Hancock, R.E., Hodges, R.S., 1996a, Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *International journal of peptide and protein research* 47, 460-466.
- Kondejewski, L.H., Farmer, S.W., Wishart, D.S., Kay, C.M., Hancock, R.E., Hodges, R.S., 1996b, Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs. *The Journal of biological chemistry* 271, 25261-25268.
- Kondejewski, L.H., Jelokhani-Niaraki, M., Farmer, S.W., Lix, B., Kay, C.M., Sykes, B.D., Hancock, R.E., Hodges, R.S., 1999, Dissociation of antimicrobial and hemolytic activities in cyclic peptide diastereomers by systematic alterations in amphipathicity. *The Journal of biological chemistry* 274, 13181-13192.
- Kondejewski, L.H., Lee, D.L., Jelokhani-Niaraki, M., Farmer, S.W., Hancock, R.E., Hodges, R.S., 2002, Optimization of microbial specificity in cyclic peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. *The Journal of biological chemistry* 277, 67-74.
- Kondo, M., Izumiya, N., 1967, Studies of peptide antibiotics. XI. Analogs of gramicidin S and cyclosemigramicidin S containing glycine or alanine in place of valine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 40, 1975-1980.

Bibliografia

- Kraus, D., Herbert, S., Kristian, S.A., Khosravi, A., Nizet, V., Gotz, F., Peschel, A., 2008, The GraRS regulatory system controls *Staphylococcus aureus* susceptibility to antimicrobial host defenses. *BMC microbiology* 8, 85.
- Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., Maciag-Gudowska, A., Brix, K., Shaw, L., Foster, T., Potempa, J., 2008, A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PloS one* 3, e1409.
- Kulkarni, M.M., McMaster, W.R., Kamysz, E., Kamysz, W., Engman, D.M., McGwire, B.S., 2006, The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Molecular microbiology* 62, 1484-1497.
- Kuo, L.C., Lai, C.C., Liao, C.H., Hsu, C.K., Chang, Y.L., Chang, C.Y., Hsueh, P.R., 2007, Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: clinical features, antimicrobial therapy and outcome. *Clin Microbiol Infect* 13, 196-198.
- Kwa, A.L., Tam, V.H., Falagas, M.E., 2008, Polymyxins: a review of the current status including recent developments. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 37, 870-883.
- Lacour, S., Bechet, E., Cozzone, A.J., Mijakovic, I., Grangeasse, C., 2008, Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PloS one* 3, e3053.
- Lai, Y., Villaruz, A.E., Li, M., Cha, D.J., Sturdevant, D.E., Otto, M., 2007, The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Molecular microbiology* 63, 497-506.
- Lakaye, B., Wirtzfeld, B., Wins, P., Grisar, T., Bettendorff, L., 2004, Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *The Journal of biological chemistry* 279, 17142-17147.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D.A., Quale, J., 2008, Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews* 21, 449-465.
- Landman, D., Quale, J.M., Mayorga, D., Adediji, A., Vangala, K., Ravishankar, J., Flores, C., Brooks, S., 2002, Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Archives of internal medicine* 162, 1515-1520.
- Larkin, E.A., Carman, R.J., Krakauer, T., Stiles, B.G., 2009, *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Current medicinal chemistry* 16, 4003-4019.
- Larsen, A., Stegger, M., Goering, R., Sorum, M., Skov, R., 2007, Emergence and dissemination of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Denmark (2000-2005). *Euro Surveill* 12.
- Lee, D.L., Hodges, R.S., 2003, Structure-activity relationships of de novo designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S. *Biopolymers* 71, 28-48.
- Lee, D.L., Powers, J.P., Pflegerl, K., Vasil, M.L., Hancock, R.E., Hodges, R.S., 2004, Effects of single D-amino acid substitutions on disruption of beta-sheet structure and hydrophobicity in cyclic 14-residue antimicrobial peptide analogs related to gramicidin S. *J Pept Res* 63, 69-84.
- Lee, J.Y., Yang, S.T., Lee, S.K., Jung, H.H., Shin, S.Y., Hahm, K.S., Kim, J.I., 2008, Salt-resistant homodimeric batenecin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. *The FEBS journal* 275, 3911-3920.

Bibliografia

- Lee, K., Yum, J.H., Yong, D., Lee, H.M., Kim, H.D., Docquier, J.D., Rossolini, G.M., Chong, Y., 2005, Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 4485-4491.
- Lee, Y.T., Huang, L.Y., Chen, T.L., Siu, L.K., Fung, C.P., Cho, W.L., Yu, K.W., Liu, C.Y., 2009, Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 42, 210-219.
- Leigh, J.A., Dodsworth, J.A., 2007, Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annual review of microbiology* 61, 349-377.
- Levin, A.S., Levy, C.E., Manrique, A.E., Medeiros, E.A., Costa, S.F., 2003, Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *International journal of antimicrobial agents* 21, 58-62.
- Li, J., Nation, R.L., Owen, R.J., Wong, S., Spelman, D., Franklin, C., 2007a, Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clin Infect Dis* 45, 594-598.
- Li, M., Cha, D.J., Lai, Y., Villaruz, A.E., Sturdevant, D.E., Otto, M., 2007b, The antimicrobial peptide-sensing system aps of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 66, 1136-1147.
- Li, M., Diep, B.A., Villaruz, A.E., Braughton, K.R., Jiang, X., DeLeo, F.R., Chambers, H.F., Lu, Y., Otto, M., 2009, Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5883-5888.
- Li, X., Li, Y., Han, H., Miller, D.W., Wang, G., 2006, Solution structures of human LL-37 fragments and NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region. *Journal of the American Chemical Society* 128, 5776-5785.
- Liechty, A., Chen, J., Jain, M.K., 2000, Origin of antibacterial stasis by polymyxin B in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* 1463, 55-64.
- Lin, X.M., Li, H., Wang, C., Peng, X.X., 2008, Proteomic analysis of nalidixic acid resistance in *Escherichia coli*: identification and functional characterization of OM proteins. *Journal of proteome research* 7, 2399-2405.
- Lincoln, L.M., Ozaki, M., Donelson, J.E., Beetham, J.K., 2004, Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. *Molecular and biochemical parasitology* 137, 185-189.
- Linden, P.K., Paterson, D.L., 2006, Parenteral and inhaled colistin for treatment of ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2, S89-94.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S.A., Agbo, E.E., Englund, P.T., 2005, Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in parasitology* 21, 363-369.
- Lodge, R., Descoteaux, A., 2005, Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 114, 256-265.
- Lopez-Martin, C., Perez-Victoria, J.M., Carvalho, L., Castanys, S., Gamarro, F., 2008, Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 4030-4036.

Bibliografia

- Luque-Ortega, J.R., Rivas, L., 2007, Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1327-1332.
- Luque-Ortega, J.R., Rivero-Lezcano, O.M., Croft, S.L., Rivas, L., 2001, In vivo monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 1121-1125.
- Luque-Ortega, J.R., Saugar, J.M., Chiva, C., Andreu, D., Rivas, L., 2003, Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *The Biochemical journal* 375, 221-230.
- Llamas-Saiz, A.L., Grotenbreg, G.M., Overhand, M., van Raaij, M.J., 2007, Double-stranded helical twisted beta-sheet channels in crystals of gramicidin S grown in the presence of trifluoroacetic and hydrochloric acids. *Acta crystallographica* 63, 401-407.
- Llobet, E., March, C., Gimenez, P., Bengoechea, J.A., 2009, Klebsiella pneumoniae OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 298-302.
- Llobet, E., Tomas, J.M., Bengoechea, J.A., 2008, Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology (Reading, England)* 154, 3877-3886.
- MacArthur, M.W., Thornton, J.M., 1991, Influence of proline residues on protein conformation. *Journal of molecular biology* 218, 397-412.
- Macfarlane, E.L., Kwasnicka, A., Ochs, M.M., Hancock, R.E., 1999, PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Molecular microbiology* 34, 305-316.
- Macvanin, M., Ballagi, A., Hughes, D., 2004, Fusidic acid-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium have low levels of heme and a reduced rate of respiration and are sensitive to oxidative stress. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 3877-3883.
- Magnusson, L.U., Nystrom, T., Farewell, A., 2003, Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approach. *The Journal of biological chemistry* 278, 968-973.
- Maier, V.H., Dorn, K.V., Gudmundsdottir, B.K., Gudmundsson, G.H., 2008, Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Molecular immunology* 45, 3723-3730.
- Mak, J.K., Kim, M.J., Pham, J., Tapsall, J., White, P.A., 2009, Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 63, 47-54.
- Mancheno, J.M., Onaderra, M., Martinez del Pozo, A., Diaz-Achirica, P., Andreu, D., Rivas, L., Gavilanes, J.G., 1996, Release of lipid vesicle contents by an antibacterial cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochemistry* 35, 9892-9899.
- Manzur, A., Dominguez, A.M., Pujol, M., Gonzalez, M.P., Limon, E., Hornero, A., Martin, R., Gudiol, F., Ariza, J., 2008, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin Microbiol Infect* 14, 377-380.
- Marr, A.K., Gooderham, W.J., Hancock, R.E., 2006, Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current opinion in pharmacology* 6, 468-472.

Bibliografia

- Marriott, H.M., Mitchell, T.J., Dockrell, D.H., 2008, Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Current molecular medicine* 8, 497-509.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Unden, G., 2006, Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 910-938.
- Mathur, J., Davis, B.M., Waldor, M.K., 2007a, Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigmaE regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Molecular microbiology* 63, 848-858.
- Mathur, J., Waldor, M.K., 2004, The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity* 72, 3577-3583.
- Mathur, P., Jagannathan, N.R., Chauhan, V.S., 2007b, Alpha,beta-dehydrophenylalanine containing cecropin-melittin hybrid peptides: conformation and activity. *J Pept Sci* 13, 253-262.
- Matsuzaki, K., 2009, Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 1687-1692.
- McConville, M.J., Mullin, K.A., Ilgoutz, S.C., Teasdale, R.D., 2002, Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 122-154; table of contents.
- Melo, M.N., Castanho, M.A., 2007, Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 1277-1290.
- Meng, H., Kumar, K., 2007, Antimicrobial activity and protease stability of peptides containing fluorinated amino acids. *Journal of the American Chemical Society* 129, 15615-15622.
- Merrifield, R.B., Juvvadi, P., Andreu, D., Ubach, J., Boman, A., Boman, H.G., 1995, Retro and retroenantio analogs of cecropin-melittin hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3449-3453.
- Merrifield, R.B., Merrifield, E.L., Juvvadi, P., Andreu, D., Boman, H.G., 1994, Design and synthesis of antimicrobial peptides. *Ciba Foundation symposium* 186, 5-20; discussion 20-26.
- Michels, P.A., Bringaud, F., Herman, M., Hannaert, V., 2006, Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 1463-1477.
- Midorikawa, K., Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Yamada, S., Fujiwara, T., Yamazaki, K., Sayama, K., Taubman, M.A., Kurihara, H., Hashimoto, K., Sugai, M., 2003, *Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infection and immunity* 71, 3730-3739.
- Millan, A.B., Dominguez, M.A., Borraz, C., Gonzalez, M.P., Almirante, B., Cercenado, E., Padilla, B., Pujol, M., Rodriguez-Bano, J., 2009, [Community-onset and nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals.]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*.
- Mogi, T., Kita, K., 2009, Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 66, 3821-3826.
- Molina, J., Cordero, E., Palomino, J., Pachon, J., 2009, [Aminoglycosides and polymyxins.]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 27, 178-188.
- Montero, A., Ariza, J., Corbella, X., Domenech, A., Cabellos, C., Ayats, J., Tubau, F., Borraz, C., Gudiol, F., 2004, Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia

Bibliografia

- model. The Journal of antimicrobial chemotherapy 54, 1085-1091.
- Moon, K., Gottesman, S., 2009, A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. Molecular microbiology 74, 1314-1330.
- Moore, R.A., Chan, L., Hancock, R.E., 1984, Evidence for two distinct mechanisms of resistance to polymyxin B in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy 26, 539-545.
- Morgan, G.W., Hall, B.S., Denny, P.W., Carrington, M., Field, M.C., 2002, The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. Trends in parasitology 18, 491-496.
- Moskowitz, S.M., Ernst, R.K., Miller, S.I., 2004, PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. Journal of bacteriology 186, 575-579.
- Moyersoen, J., Choe, J., Fan, E., Hol, W.G., Michels, P.A., 2004, Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. FEMS microbiology reviews 28, 603-643.
- Muller, U., Vogel, P., Alber, G., Schaub, G.A., 2008, The innate immune system of mammals and insects. Contributions to microbiology 15, 21-44.
- Murray, H.W., 2000, Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. Int J Infect Dis 4, 158-177.
- Murray, S.R., Ernst, R.K., Bermudes, D., Miller, S.I., Low, K.B., 2007, pmrA(Con) confers pmrHFIJKL-dependent EGTA and polymyxin resistance on msbB *Salmonella* by decorating lipid A with phosphoethanolamine. Journal of bacteriology 189, 5161-5169.
- Musa, E.K., Desai, N., Casewell, M.W., 1990, The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. The Journal of hospital infection 15, 219-227.
- Mussi, M.A., Limansky, A.S., Viale, A.M., 2005, Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. Antimicrobial agents and chemotherapy 49, 1432-1440.
- Na, D.H., Faraj, J., Capan, Y., Leung, K.P., DeLuca, P.P., 2007, Stability of antimicrobial decapeptide (KSL) and its analogues for delivery in the oral cavity. Pharmaceutical research 24, 1544-1550.
- Nadim, A., Javadian, E., Tahvildar-Bidruni, G., Ghorbani, M., 1983, Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales 76, 377-383.
- Nagamurthi, G., Rambhav, S., 1985, Gramicidin-S: Structure-activity relationship J. Biosci., 323-329.
- Nagaoka, I., Kuwahara-Arai, K., Tamura, H., Hiramatsu, K., Hirata, M., 2005, Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions. Inflamm Res 54, 66-73.
- Naimi, T.S., LeDell, K.H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S.M., Boxrud, D.J., Etienne, J., Johnson, S.K., Vandenesch, F., Fridkin, S., O'Boyle, C., Danila, R.N., Lynfield, R., 2003, Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Jama 290, 2976-2984.

Bibliografia

- Navarre, W.W., Schneewind, O., 1999, Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 174-229.
- NCCLS, C., 2000, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 20.
- Nekhotiaeva N, E.A., Rajarao G K, Hällbrink M., Langel U, a.G.L., 2003, Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides *The FASEB Journal* 35.
- Nelson, E.A., O'Meara, S., Golder, S., Dalton, J., Craig, D., Iglesias, C., 2006, Systematic review of antimicrobial treatments for diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 23, 348-359.
- Nell, M.J., Tjabringa, G.S., Wafelman, A.R., Verrijk, R., Hiemstra, P.S., Drijfhout, J.W., Grote, J.J., 2006, Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides* 27, 649-660.
- Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L., 2004, Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *Journal of medical microbiology* 53, 1233-1240.
- Ng, J., Gosbell, I.B., Kelly, J.A., Boyle, M.J., Ferguson, J.K., 2006, Cure of multiresistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infections with intraventricular or intrathecal colistin: case series and literature review. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58, 1078-1081.
- Nijnik, A., Hancock, R.E., 2009, The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Current opinion in hematology* 16, 41-47.
- Nishida, M., Imura, Y., Yamamoto, M., Kobayashi, S., Yano, Y., Matsuzaki, K., 2007, Interaction of a magainin-PGLa hybrid peptide with membranes: insight into the mechanism of synergism. *Biochemistry* 46, 14284-14290.
- Nitzan, Y., Pechatnikov, I., Bar-El, D., Wexler, H., 1999, Isolation and characterization of heat-modifiable proteins from the outer membrane of *Porphyromonas asaccharolytica* and *Acinetobacter baumannii*. *Anaerobe* 5, 43-50.
- Nizet, V., 2006, Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Current issues in molecular biology* 8, 11-26.
- Nos-Barbera, S., Portoles, M., Morilla, A., Ubach, J., Andreu, D., Paterson, C.A., 1997, Effect of hybrid peptides of cecropin A and melittin in an experimental model of bacterial keratitis. *Cornea* 16, 101-106.
- Nunez-Corcuera, B., Serafimidis, I., Arias-Palomo, E., Rivera-Calzada, A., Suarez, T., 2008, A new protein carrying an NmrA-like domain is required for cell differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental biology* 321, 331-342.
- O'Neill, A.J., McLaws, F., Kahlmeter, G., Henriksen, A.S., Chopra, I., 2007, Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1737-1740.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B., and Kolter, R., 1999, Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310, 91-109.
- Ogston, A., 1883, Micrococcus poisoning. *J. Anat. Physiol.* 17, 24-58.
- Oh, J.T., Cajal, Y., Skowronska, E.M., Belkin, S., Chen, J., Van Dyk, T.K., Sasser, M., Jain, M.K., 2000, Cationic peptide antimicrobials induce selective transcription of *micF* and *osmY* in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* 1463, 43-54.

Bibliografia

- Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G., 2005, Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical microbiology reviews* 18, 293-305.
- Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L., Leung, D.Y., 2002, Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *The New England journal of medicine* 347, 1151-1160.
- Oppenheimer, F.R., 1990, The glycosome of trypanosomes and *Leishmania*. *Biochemical Society transactions* 18, 729-731.
- Oppenheimer, F.R., Borst, P., 1977, Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS letters* 80, 360-364.
- Orlova, T.I., Bulgakova, V.G., Polin, A.N., Grushina, V.A., 2007, [Cell wall components in *Staphylococcus aureus* with double resistance to gramicidin S and actinomycin D]. *Antibiotiki i khimioterapiia = Antibiotics and chemotherapy [sic] / Ministerstvo meditsinskoi i mikrobiologicheskoi promyshlennosti SSSR* 52, 3-8.
- Osapay, K., Tran, D., Ladokhin, A.S., White, S.H., Henschen, A.H., Selsted, M.E., 2000, Formation and characterization of a single Trp-Trp cross-link in indolicidin that confers protease stability without altering antimicrobial activity. *The Journal of biological chemistry* 275, 12017-12022.
- Oudhoff, M.J., Kroeze, K.L., Nazmi, K., van den Keijbus, P.A., van 't Hof, W., Fernandez-Borja, M., Hordijk, P.L., Gibbs, S., Bolscher, J.G., Veerman, E.C., 2009, Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1,000-fold. *FASEB J* 23, 3928-3935.
- Ouellette, M., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B., 2004, Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 7, 257-266.
- Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Nishi, H., Fujiwara, T., Fujiue, Y., Kuwabara, M., Sayama, K., Hashimoto, K., Sugai, M., 2008, Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 61, 1266-1269.
- Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E.C., Rehm, B.H., Hancock, R.E., 2008, Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and immunity* 76, 4176-4182.
- Owen, R.J., Li, J., Nation, R.L., Spelman, D., 2007, In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 59, 473-477.
- Oyston, P.C., Fox, M.A., Richards, S.J., Clark, G.C., 2009, Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *Journal of medical microbiology* 58, 977-987.
- Pachon-Ibanez, M.E., Docobo-Perez, F., Lopez-Rojas, R., Dominguez-Herrera, J., Jimenez-Mejias, M.E., Garcia-Curiel, A., Pichardo, C., Jimenez, L., Pachon, J., 2010, Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 1165-1172.
- Palatnik-de-Sousa, C.B., 2008, Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26, 1709-1724.

Bibliografia

- Palavecino, E., 2007, Clinical, Epidemiological, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections. *Methods in Molecular Biology: MRSA Protocols*.
- Panton, P.N., Valentine, F.C.O., 1932, Staphylococcal toxin. *Lancet* 1, 506-508.
- Pantopoulou, A., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Raftogannis, M., Tsaganos, T., Dontas, I., Koutoukas, P., Baziaka, F., Giamarellou, H., Perrea, D., 2007, Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the significance of co-administration of rifampicin. *International journal of antimicrobial agents* 29, 51-55.
- Papo, N., Oren, Z., Pag, U., Sahl, H.G., Shai, Y., 2002, The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *The Journal of biological chemistry* 277, 33913-33921.
- Parent, R., Roy, P.H., 1992, The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424: a new breed of cat. *Journal of bacteriology* 174, 2891-2897.
- Patel, J.B., Gorwitz, R.J., Jernigan, J.A., 2009, Mupirocin resistance. *Clin Infect Dis* 49, 935-941.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008, *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews* 21, 538-582.
- Perez-Victoria, F.J., Castanys, S., Gamarro, F., 2003, *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 2397-2403.
- Perez-Victoria, F.J., Sanchez-Canete, M.P., Seifert, K., Croft, S.L., Sundar, S., Castanys, S., Gamarro, F., 2006, Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* 9, 26-39.
- Perez, L.E., Chandrasekar, B., Saldarriaga, O.A., Zhao, W., Arteaga, L.T., Travi, B.L., Melby, P.C., 2006, Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176, 5519-5528.
- Peschel, A., Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., 2001, *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *The Journal of experimental medicine* 193, 1067-1076.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., Gotz, F., 1999, Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *The Journal of biological chemistry* 274, 8405-8410.
- Peschel, A., Sahl, H.G., 2006, The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature reviews* 4, 529-536.
- Peters, W., 1988, Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene presidential address. Manson House, 15 October 1987. "The little sister"--a tale of Arabia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 179-184.
- Pirri, G., Giuliani, A., Nicoletto, S.F., Pizzuto, L., Rinaldi, A.C., 2009, Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. *Cent. Eur. J. Biol.* 4, 258-273.
- Ploy, M.C., Giamarellou, H., Bourlioux, P., Courvalin, P., Lambert, T., 1994, Detection of *aac(6)-I* genes in amikacin-resistant *Acinetobacter spp.* by PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38, 2925-2928.

Bibliografia

- Pohlmann, J., Brotz-Oesterhelt, H., 2004, New aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents. *Current drug targets* 4, 261-272.
- Porcelli, F., Verardi, R., Shi, L., Henzler-Wildman, K.A., Ramamoorthy, A., Veglia, G., 2008, NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry* 47, 5565-5572.
- Poudyal, A., Howden, B.P., Bell, J.M., Gao, W., Owen, R.J., Turnidge, J.D., Nation, R.L., Li, J., 2008, In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 62, 1311-1318.
- Prenner, E.J., Kiricsi, M., Jelokhani-Niaraki, M., Lewis, R.N., Hodges, R.S., McElhaney, R.N., 2005, Structure-activity relationships of diastereomeric lysine ring size analogs of the antimicrobial peptide gramicidin S: mechanism of action and discrimination between bacterial and animal cell membranes. *The Journal of biological chemistry* 280, 2002-2011.
- Prenner, E.J., Lewis, R.N., McElhaney, R.N., 1999, The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1462, 201-221.
- Pujol, M., Pena, C., Pallares, R., Ayats, J., Ariza, J., Gudiol, F., 1994, Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13, 96-102.
- Ragle, B.E., Bubeck Wardenburg, J., 2009, Anti-alpha-hemolysin monoclonal antibodies mediate protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infection and immunity* 77, 2712-2718.
- Rahal, J.J., 2006, Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2, S95-99.
- Rainey, P.M., Spithill, T.W., McMahon-Pratt, D., Pan, A.A., 1991, Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. *Molecular and biochemical parasitology* 49, 111-118.
- Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P., Loiseau, P.M., 2007, Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1425-1430.
- Ramalingam, K., Bello, J., 1992, Effect of permethylation on the haemolytic activity of melittin. *The Biochemical journal* 284 (Pt 3), 663-665.
- Ramanathan, B., Davis, E.G., Ross, C.R., Blecha, F., 2002, Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 361-372.
- Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., Dagger, F., Cohen, B.E., 1996, Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *The Journal of membrane biology* 152, 65-75.
- Ratledge, C., 2007, Iron metabolism and infection. *Food and nutrition bulletin* 28, S515-523.
- Rautenbach, M., Vlok, N.M., Stander, M., Hoppe, H.C., 2007, Inhibition of malaria parasite blood stages by tyrocidines, membrane-active cyclic peptide antibiotics from *Bacillus brevis*. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 1488-1497.
- Raynaud, C., Charbit, A., 2005, Regulation of expression of type I signal peptidases in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology (Reading, England)* 151, 3769-3776.
- Rello, J., 1999, *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU: customization is the key. *Chest* 115, 1226-1229.

Bibliografia

- Resende, J.M., Moraes, C.M., Munhoz, V.H., Aisenbrey, C., Verly, R.M., Bertani, P., Cesar, A., Pilo-Veloso, D., Bechinger, B., 2009, Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16639-16644.
- Rieg, S., Steffen, H., Seeber, S., Humeny, A., Kalbacher, H., Dietz, K., Garbe, C., Schitteck, B., 2005, Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J Immunol* 174, 8003-8010.
- Rivas, L., Kahl, L., Manson, K., McMahon-Pratt, D., 1991, Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Molecular and biochemical parasitology* 47, 235-243.
- Rivas, L., Luque-Ortega, J.R., Andreu, D., 2009, Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: lessons from parasites. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 1570-1581.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J., 2003, Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and biochemical parasitology* 126, 129-142.
- Roberts, D.M., Rowe, P.M., Siegel, F.L., Lukas, T.J., Watterson, D.M., 1986, Trimethyllysine and protein function. Effect of methylation and mutagenesis of lysine 115 of calmodulin on NAD kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 261, 1491-1494.
- Roca, I., Marti, S., Espinal, P., Martinez, P., Gibert, I., Vila, J., 2009, CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 4013-4014.
- Rodriguez-Bano, J., Angeles Dominguez, M., Blas Millan, A., Borraz, C., Pau Gonzalez, M., Almirante, B., Cercenado, E., Padilla, B., Pujol, M., 2009, Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. *Clin Microbiol Infect* 15, 1111-1118.
- Rodriguez-Bano, J., Marti, S., Soto, S., Fernandez-Cuenca, F., Cisneros, J.M., Pachon, J., Pascual, A., Martinez-Martinez, L., McQueary, C., Actis, L.A., Vila, J., 2008, Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 14, 276-278.
- Rodriguez-Hernandez, M.J., Jimenez-Mejias, M.E., Pichardo, C., Cuberos, L., Garcia-Curiel, A., Pachon, J., 2004, Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 10, 581-584.
- Rodriguez-Hernandez, M.J., Pachon, J., Pichardo, C., Cuberos, L., Ibanez-Martinez, J., Garcia-Curiel, A., Caballero, F.J., Moreno, I., Jimenez-Mejias, M.E., 2000, Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 45, 493-501.
- Rodriguez-Hernandez, M.J., Saugar, J., Docobo-Perez, F., de la Torre, B.G., Pachon-Ibanez, M.E., Garcia-Curiel, A., Fernandez-Cuenca, F., Andreu, D., Rivas, L., Pachon, J., 2006, Studies on the antimicrobial activity of cecropin A-melittin hybrid peptides in colistin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58, 95-100.

Bibliografia

- Rogers, K.A., DeKrey, G.K., Mbow, M.L., Gillespie, R.D., Brodskyn, C.I., Titus, R.G., 2002, Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. FEMS microbiology letters 209, 1-7.
- Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A., Bates, P.A., 2004, Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature 430, 463-467.
- Roncada, P., Deriu, F., Gaviraghi, A., Martino, P.A., Bonizzi, L., 2009, Proteomic study of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains. Veterinary research communications 33 Suppl 1, 157-160.
- Rosenfeld, Y., Shai, Y., 2006, Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. Biochimica et biophysica acta 1758, 1513-1522.
- Roy, H., Ibba, M., 2008, Monitoring Lys-tRNA(Lys) phosphatidylglycerol transferase activity. Methods (San Diego, Calif 44, 164-169.
- Runge, M.H., Andreesen, R., Pfleiderer, A., Munder, P.G., 1980, Destruction of human solid tumors by alkyl lysophospholipids. Journal of the National Cancer Institute 64, 1301-1306.
- Ryan, K.A., Garraway, L.A., Descoteaux, A., Turco, S.J., Beverley, S.M., 1993, Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 8609-8613.
- Sacks, D.L., Perkins, P.V., 1984, Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science (New York, N.Y 223, 1417-1419.
- Sal-Man, N., Oren, Z., Shai, Y., 2002, Preassembly of membrane-active peptides is an important factor in their selectivity toward target cells. Biochemistry 41, 11921-11930.
- Salgado, J., Grage, S.L., Kondejewski, L.H., Hodges, R.S., McElhaney, R.N., Ulrich, A.S., 2001, Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial beta-sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state 19F-NMR. Journal of biomolecular NMR 21, 191-208.
- Sang, Y., Blecha, F., 2008, Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 9, 227-235.
- Sato, K., kato, R., Nagai, U., 1986, Studies on β -Turn of Peptides. XII. Synthetic Confirmation of Weak Activity of [D-Pro5,5']-Gramicidin S Predicted from β -Turn Preference of Its Partial Sequence. Bull. Chem.Soc. Jpn. 59, 535-538.
- Sato, K., Nakae, T., 1991, Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. The Journal of antimicrobial chemotherapy 28, 35-45.
- Saugar, J.M., Alarcon, T., Lopez-Hernandez, S., Lopez-Brea, M., Andreu, D., Rivas, L., 2002, Activities of polymyxin B and cecropin A-melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy 46, 875-878.
- Saugar, J.M., Rodriguez-Hernandez, M.J., de la Torre, B.G., Pachon-Ibanez, M.E., Fernandez-Reyes, M., Andreu, D., Pachon, J., Rivas, L., 2006, Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. Antimicrobial agents and chemotherapy 50, 1251-1256.
- Sawhney, R., Berry, V., 2009, Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview. Indian journal of medical sciences 63, 313-321.

Bibliografia

- Scott, M.G., Hancock, R.E., 2000, Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Critical reviews in immunology* 20, 407-431.
- Scoumanne, A., Chen, X., 2008, Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histology and histopathology* 23, 1143-1149.
- Schaeffler, S., 1989, Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones. *Journal of clinical microbiology* 27, 335-336.
- Schindler, P.R., Teuber, M., 1975, Action of polymyxin B on bacterial membranes: morphological changes in the cytoplasm and in the outer membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 8, 95-104.
- Schmidt, G.M.J., Hodgkin, D.C., Oughton, B.M., 1957, *Biochem J.* 65, 744-756.
- Schmitz, F.J., Fluit, A.C., Gondolf, M., Beyrau, R., Lindenlauf, E., Verhoef, J., Heinz, H.P., Jones, M.E., 1999a, The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 43, 253-259.
- Schmitz, F.J., Kohrer, K., Scheuring, S., Verhoef, J., Fluit, A., Heinz, H.P., Jones, M.E., 1999b, The stability of *grlA*, *grlB*, *gyrA*, *gyrB* and *norA* mutations and MIC values of five fluoroquinolones in three different clonal populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 5, 287-290.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2002, Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends in biochemical sciences* 27, 396-402.
- Schweizer, F., 2009, Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *European journal of pharmacology* 625, 190-194.
- Secundino, N., Kimblin, N., Peters, N.C., Lawyer, P., Capul, A.A., Beverley, S.M., Turco, S.J., Sacks, D., 2010, Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cellular microbiology*.
- Secundino, N.F., Eger-Mangrich, I., Braga, E.M., Santoro, M.M., Pimenta, P.F., 2005, *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *Journal of medical entomology* 42, 928-938.
- Seeber, F., 2000, An enzyme-release assay for the assessment of the lytic activities of complement or antimicrobial peptides on extracellular *Toxoplasma gondii*. *Journal of microbiological methods* 39, 189-196.
- Sepulveda, M., Ruiz, M., Bello, H., Dominguez, M., Martinez, M.A., Pinto, M.E., Gonzalez, G., Mella, S., Zemelman, R., 1998, Adherence of *Acinetobacter baumannii* to rat bladder tissue. *Microbios* 95, 45-53.
- Shai, Y., Oren, Z., 2001, From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* 22, 1629-1641.
- Shanson, D.C., 1981, Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of hospital infection* 2, 11-36.
- Shin, J.H., Lee, H.W., Kim, S.M., Kim, J., 2009, Proteomic analysis of *Acinetobacter baumannii* in biofilm and planktonic growth mode. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 47, 728-735.
- Shin, S.Y., Kang, J.H., Hahm, K.S., 1999, Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J Pept Res* 53, 82-90.
- Shin, S.Y., Lee, M.K., Kim, K.L., Hahm, K.S., 1997, Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J Pept Res* 50, 279-285.

Bibliografia

- Shogomori, H., Kobayashi, T., 2008, Lysenin: a sphingomyelin specific pore-forming toxin. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 612-618.
- Shorr, A.F., 2007, Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis* 45 Suppl 3, S171-176.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wojcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., Potempa, J., 2004, Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 4673-4679.
- Sierra, J.M., Ortega, M., Tarrago, C., Albet, C., Vila, J., Terencio, J., Guglietta, A., 2009, Decreased linezolid uptake in an in vitro-selected linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* mutant. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64, 990-992.
- Sindermann, H., Croft, S.L., Engel, K.R., Bommer, W., Eibl, H.J., Unger, C., Engel, J., 2004, Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical microbiology and immunology* 193, 173-180.
- Singh, V.K., Ghosh, I., 2006, Kinetic modeling of tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass in *Mycobacterium tuberculosis*, and its application to assessment of drug targets. *Theoretical biology & medical modelling* 3, 27.
- Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Van Dorselaer, A., Boyer-Mariotte, S., Jouenne, T., De, E., 2006, Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *Journal of proteome research* 5, 3385-3398.
- Siroy, A., Molle, V., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Pestel-Caron, M., Cozzone, A.J., Jouenne, T., De, E., 2005, Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 4876-4883.
- Skov, R.L., Jensen, K.S., 2009, Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of hospital-acquired infections. *The Journal of hospital infection* 73, 364-370.
- Smith, A.C., Yardley, V., Rhodes, J., Croft, S.L., 2000, Activity of the novel immunomodulatory compound tucarezol against experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 1494-1498.
- Smith, B.C., Denu, J.M., 2009, Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochimica et biophysica acta* 1789, 45-57.
- Smith, M.G., Gianoulis, T.A., Pukatzki, S., Mekalanos, J.J., Ornston, L.N., Gerstein, M., Snyder, M., 2007, New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & development* 21, 601-614.
- Smith, P.A., Romesberg, F.E., 2007, Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nature chemical biology* 3, 549-556.
- Soares, N.C., Cabral, M.P., Gayoso, C., Mallo, S., Rodriguez-Velo, P., Fernandez-Moreira, E., Bou, G., 2010, Associating growth-phase-related changes in the proteome of *Acinetobacter baumannii* with increased resistance to oxidative stress. *Journal of proteome research* 9, 1951-1964.
- Soballe, B., Poole, R.K., 1999, Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology (Reading, England)* 145 (Pt 8), 1817-1830.

Bibliografia

- Solanas, C., de la Torre, B.G., Fernandez-Reyes, M., Santiveri, C.M., Jimenez, M.A., Rivas, L., Jimenez, A.I., Andreu, D., Cativiela, C., 2009, Therapeutic index of gramicidin S is strongly modulated by D-phenylalanine analogues at the beta-turn. *Journal of medicinal chemistry* 52, 664-674.
- Solanas, C., de la Torre, B.G., Fernandez-Reyes, M., Santiveri, C.M., Jimenez, M.A., Rivas, L., Jimenez, A.I., Andreu, D., Cativiela, C., 2010, Sequence inversion and phenylalanine surrogate at the *beta*-turn enhance the antibiotic activity of gramicidin S. *Journal of medicinal chemistry*.
- Soon, R.L., Nation, R.L., Hartley, P.G., Larson, I., Li, J., 2009, Atomic force microscopy investigation of the morphology and topography of colistin-heteroresistant *Acinetobacter baumannii* strains as a function of growth phase and in response to colistin treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 4979-4986.
- Sorensen, O.E., Borregaard, N., 2005, Cathelicidins--nature's attempt at combinatorial chemistry. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 8, 273-280.
- Sorensen, O.E., Follin, P., Johnsen, A.H., Calafat, J., Tjabringa, G.S., Hiemstra, P.S., Borregaard, N., 2001, Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97, 3951-3959.
- Spinosa, M.R., Progida, C., Tala, A., Cogli, L., Alifano, P., Bucci, C., 2007, The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infection and immunity* 75, 3594-3603.
- Stam-Bolink, E.M., Mithoe, D., Baas, W.H., Arends, J.P., Moller, A.V., 2007, Spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80 strain in the community of the northern Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26, 723-727.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H.G., 1981, Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-248.
- Steinstraesser, L., Kraneburg, U.M., Hirsch, T., Kesting, M., Steinau, H.U., Jacobsen, F., Al-Benna, S., 2009, Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance? *International journal of molecular sciences* 10, 3951-3970.
- Steinstraesser, L., Ring, A., Bals, R., Steinau, H.U., Langer, S., 2006, The human host defense peptide LL37/hCAP accelerates angiogenesis in PEGT/PBT biopolymers. *Annals of plastic surgery* 56, 93-98.
- Stie, J., Jesaitis, A.V., Lord, C.I., Gripentrog, J.M., Taylor, R.M., Burritt, J.B., Jesaitis, A.J., 2007, Localization of hCAP-18 on the surface of chemoattractant-stimulated human granulocytes: analysis using two novel hCAP-18-specific monoclonal antibodies. *Journal of leukocyte biology* 82, 161-172.
- Stuart, K., Panigrahi, A.K., 2002, RNA editing: complexity and complications. *Molecular microbiology* 45, 591-596.
- Subramanian, K., Jia, D., Kapoor-Vazirani, P., Powell, D.R., Collins, R.E., Sharma, D., Peng, J., Cheng, X., Vertino, P.M., 2008, Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Molecular cell* 30, 336-347.
- Sudhandiran, G., Shaha, C., 2003, Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *The Journal of biological chemistry* 278, 25120-25132.

Bibliografia

- Sun, S., Negrea, A., Rhen, M., Andersson, D.I., 2009, Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 2298-2305.
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Sinha, P.K., Bhattacharya, S.K., 2007, Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *The New England journal of medicine* 356, 2571-2581.
- Sundar, S., Rosenkaimer, F., Makharia, M.K., Goyal, A.K., Mandal, A.K., Voss, A., Hilgard, P., Murray, H.W., 1998, Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet* 352, 1821-1823.
- Tachi, T., Epand, R.F., Epand, R.M., Matsuzaki, K., 2002, Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity. *Biochemistry* 41, 10723-10731.
- Tamaki, M., Kokuno, M., Suzuki, Y., Iwama, M., Shindo, M., Uchida, Y., 2008, A novel polycationic analogue of gramicin with antibiotic activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *The Journal of antibiotics* 61, 33-35.
- Tamaki, M., Okitsu, T., Araki, M., Sakamoto, H., Takimoto, M., Muramatsu, I., 1985, Synthesis and properties of gramicidin S analogs containing Pro-D-Phe sequence in place of D-Phe-Pro sequence in the δ -turn part of the antibiotic. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 58, 531-535.
- Tan, B.H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M.T., Krutzik, S.R., Bloom, B.R., Ganz, T., Modlin, R.L., Stenger, S., 2006, Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol* 177, 1864-1871.
- Taylor, K., McCullough, B., Clarke, D.J., Langley, R.J., Pechenick, T., Hill, A., Campopiano, D.J., Barran, P.E., Dorin, J.R., Govan, J.R., 2007, Covalent dimer species of beta-defensin Defr1 display potent antimicrobial activity against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1719-1724.
- Taylor, S.W., Craig, A.G., Fischer, W.H., Park, M., Lehrer, R.I., 2000, Styelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes. *The Journal of biological chemistry* 275, 38417-38426.
- Tenover, F.C., McDonald, L.C., 2005, Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Current opinion in infectious diseases* 18, 300-305.
- Thwaite, J.E., Hibbs, S., Titball, R.W., Atkins, T.P., 2006, Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Bacillus anthracis* may contribute to virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 2316-2322.
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., Actis, L.A., 2003, Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology (Reading, England)* 149, 3473-3484.
- Towner, K.J., 2009, *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *The Journal of hospital infection* 73, 355-363.
- Travis, S.M., Anderson, N.N., Forsyth, W.R., Espiritu, C., Conway, B.D., Greenberg, E.P., McCray, P.B., Jr., Lehrer, R.I., Welsh, M.J., Tack, B.F., 2000, Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infection and immunity* 68, 2748-2755.

Bibliografia

- Tristan, A., Ferry, T., Durand, G., Dauwalder, O., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J., 2007, Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Journal of hospital infection 65 Suppl 2, 105-109.
- Trotti, A., Garden, A., Warde, P., Symonds, P., Langer, C., Redman, R., Pajak, T.F., Fleming, T.R., Henke, M., Bourhis, J., Rosenthal, D.I., Junor, E., Cmelak, A., Sheehan, F., Pulliam, J., Devitt-Risse, P., Fuchs, H., Chambers, M., O'Sullivan, B., Ang, K.K., 2004, A multinational, randomized phase III trial of iseganan HCl oral solution for reducing the severity of oral mucositis in patients receiving radiotherapy for head-and-neck malignancy. International journal of radiation oncology, biology, physics 58, 674-681.
- Turco, S.J., Hull, S.R., Orlandi, P.A., Jr., Shepherd, S.D., Homans, S.W., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., 1987, Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. Biochemistry 26, 6233-6238.
- Turnidge, J.D., Bell, J.M., 2000, Methicillin-resistant *Staphylococcal aureus* evolution in Australia over 35 years. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y 6, 223-229.
- Tzeng, Y.L., Ambrose, K.D., Zughair, S., Zhou, X., Miller, Y.K., Shafer, W.M., Stephens, D.S., 2005, Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. Journal of bacteriology 187, 5387-5396.
- Unlu, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997, Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis 18, 2071-2077.
- Uzzell, T., Stolzenberg, E.D., Shinnar, A.E., Zasloff, M., 2003, Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. Peptides 24, 1655-1667.
- Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2005, Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Research in microbiology 156, 626-633.
- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P., Claey, G., Verschraegen, G., 1995, Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Journal of clinical microbiology 33, 11-15.
- Vanlerberghe, V., Diap, G., Guerin, P.J., Meheus, F., Gerstl, S., Van der Stuyft, P., Boelaert, M., 2007, Drug policy for visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis. Trop Med Int Health 12, 274-283.
- Vara Prasad, J.V.N., 2007, New oxacilidinones. Current opinion in microbiology 10, 454-460.
- Vardakas, K.Z., Matthaiou, D.K., Falagas, M.E., 2009, Comparison of community-acquired pneumonia due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* producing the Pantone-Valentine leukocidin. Int J Tuberc Lung Dis 13, 1476-1485.
- Vercesi, A.E., Docampo, R., 1992, Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. The Biochemical journal 284 (Pt 2), 463-467.
- Vercesi, A.E., Rodrigues, C.O., Catisti, R., Docampo, R., 2000, Presence of a Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. FEBS letters 473, 203-206.
- Verma, N.K., Singh, G., Dey, C.S., 2007, Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. Experimental parasitology 116, 1-13.

Bibliografia

- Vila, J., Marcos, A., Marco, F., Abdalla, S., Vergara, Y., Reig, R., Gomez-Lus, R., Jimenez de Anta, T., 1993, In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy 37, 138-141.
- Vila, J., Marti, S., Sanchez-Céspedes, J., 2007, Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. The Journal of antimicrobial chemotherapy 59, 1210-1215.
- Villalobo, A., Roldan, J.M., Rivas, J., CardenasJ, 1977, Assimilatory nitrate reductase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Archives of microbiology 112, 127-132.
- Voyich, J.M., Otto, M., Mathema, B., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Welty, D., Long, R.D., Dorward, D.W., Gardner, D.J., Lina, G., Kreiswirth, B.N., DeLeo, F.R., 2006, Is Pantón-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? The Journal of infectious diseases 194, 1761-1770.
- Vunnam, S., Juvvadi, P., Rotondi, K.S., Merrifield, R.B., 1998, Synthesis and study of normal, enantio, retro, and retroenantio isomers of cecropin A-melittin hybrids, their end group effects and selective enzyme inactivation. J Pept Res 51, 38-44.
- Waki, M., Abe, O., Okawa, R., Kato, T., Makisumi, S., Izumiya, N., 1967, Studies of peptide antibiotics. XII. Syntheses of [2,2'-alpha,gamma-diaminobutyric acid]- and [2,2'-lysine]-gramicidin S. Bulletin of the Chemical Society of Japan 40, 2904-2909.
- Walzer, G., Rosenberg, E., Ron, E.Z., 2006, The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. Environmental microbiology 8, 1026-1032.
- Wanasen, N., Soong, L., 2008, L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. Immunologic research 41, 15-25.
- Wang, G., Li, X., Wang, Z., 2009, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic acids research 37, D933-937.
- Wang, G., Watson, K.M., Buckheit, R.W., Jr., 2008a, Anti-human immunodeficiency virus type 1 activities of antimicrobial peptides derived from human and bovine cathelicidins. Antimicrobial agents and chemotherapy 52, 3438-3440.
- Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.H., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., DeLeo, F.R., Otto, M., 2007, Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nature medicine 13, 1510-1514.
- Wang, W.B., Chen, I.C., Jiang, S.S., Chen, H.R., Hsu, C.Y., Hsueh, P.R., Hsu, W.B., Liaw, S.J., 2008b, Role of RppA in the regulation of polymyxin b susceptibility, swarming, and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. Infection and immunity 76, 2051-2062.
- Warner, D.M., Levy, S.B., 2010, Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob on susceptibility of *Escherichia coli* to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-dependent CAMP induction of the marRAB operon. Microbiology (Reading, England) 156, 570-578.
- Wassef, M.K., Fioretti, T.B., Dwyer, D.M., 1985, Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes. Lipids 20, 108-115.
- Wasunna, M.K., Rashid, J.R., Mbui, J., Kirigi, G., Kinoti, D., Lodenyo, H., Felton, J.M., Sabin, A.J., Albert, M.J., Horton, J., 2005, A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. The American journal of tropical medicine and hygiene 73, 871-876.
- Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E.,

Bibliografia

- Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., Tenover, F.C., 2003, Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science (New York, N.Y 302, 1569-1571.
- Witte, W., Cuny, C., Strommenger, B., Braulke, C., Heuck, D., 2004, Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. Euro Surveill 9, 16-18.
- Wolff, M., Joly-Guillou, M.L., Farinotti, R., Carbon, C., 1999, In vivo efficacies of combinations of beta-lactams, beta-lactamase inhibitors, and rifampin against *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. Antimicrobial agents and chemotherapy 43, 1406-1411.
- Woodford, N., Livermore, D.M., 2009, Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. The Journal of infection 59 Suppl 1, S4-16.
- Wyllie, S., Cunningham, M.L., Fairlamb, A.H., 2004, Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. The Journal of biological chemistry 279, 39925-39932.
- Xiao, Y., Cai, Y., Bommineni, Y.R., Fernando, S.C., Prakash, O., Gilliland, S.E., Zhang, G., 2006, Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity. The Journal of biological chemistry 281, 2858-2867.
- Xu, D., Liew, F.Y., 1994, Genetic vaccination against leishmaniasis. Vaccine 12, 1534-1536.
- Yamada, K., Shinoda, S.S., Oku, H., Komagoe, K., Katsu, T., Katakai, R., 2006, Synthesis of low-hemolytic antimicrobial dehydropeptides based on gramicidin s. Journal of medicinal chemistry 49, 7592-7595.
- Yamada, K., Unno, M., Kobayashi, K., Oku, H., Yamamura, H., Araki, S., Matsumoto, H., Katakai, R., Kawai, M., 2002, Stereochemistry of protected ornithine side chains of gramicidin S derivatives: X-ray crystal structure of the bis-Boc-tetra-N-methyl derivative of gramicidin S. Journal of the American Chemical Society 124, 12684-12688.
- Yamamoto, S., Okujo, N., Sakakibara, Y., 1994, Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. Archives of microbiology 162, 249-254.
- Yang, L., Gordon, V.D., Mishra, A., Som, A., Purdy, K.R., Davis, M.A., Tew, G.N., Wong, G.C., 2007, Synthetic antimicrobial oligomers induce a composition-dependent topological transition in membranes. Journal of the American Chemical Society 129, 12141-12147.
- Yang, X.D., Huang, B., Li, M., Lamb, A., Kelleher, N.L., Chen, L.F., 2009, Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit. The EMBO journal 28, 1055-1066.
- Yao, C., 2010, Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? Infection and immunity 78, 22-31.
- Yevtushenko, D.P., Romero, R., Forward, B.S., Hancock, R.E., Kay, W.W., Misra, S., 2005, Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. Journal of experimental botany 56, 1685-1695.
- Yim, H.H., Villarejo, M., 1992, osmY, a new hyperosmotically inducible gene, encodes a periplasmic protein in *Escherichia coli*. Journal of bacteriology 174, 3637-3644.

Bibliografia

- Yu, J., Mookherjee, N., Wee, K., Bowdish, D.M., Pistolic, J., Li, Y., Rehaume, L., Hancock, R.E., 2007, Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1 β , augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol* 179, 7684-7691.
- Yun, S.H., Choi, C.W., Park, S.H., Lee, J.C., Leem, S.H., Choi, J.S., Kim, S., Kim, S.I., 2008, Proteomic analysis of outer membrane proteins from *Acinetobacter baumannii* DU202 in tetracycline stress condition. *Journal of microbiology* (Seoul, Korea) 46, 720-727.
- Zarrilli, R., Casillo, R., Di Popolo, A., Tripodi, M.F., Bagattini, M., Cuccurullo, S., Crivaro, V., Ragone, E., Mattei, A., Galdieri, N., Triassi, M., Utili, R., 2007, Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect* 13, 481-489.
- Zelezetsky, I., Tossi, A., 2006, Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et biophysica acta* 1758, 1436-1449.
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., Bishai, W.R., 2005, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *The Lancet infectious diseases* 5, 275-286.
- Zhao, H., Gan, T.X., Liu, X.D., Jin, Y., Lee, W.H., Shen, J.H., Zhang, Y., 2008, Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. *Peptides* 29, 1685-1691.
- Zhao, Z., Ma, Y., Dai, C., Zhao, R., Li, S., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2009, Imcporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 3472-3477.
- Zhou, Y., Bhattacharjee, H., Mukhopadhyay, R., 2006, Bifunctional role of the leishmanial antimonate reductase LmACR2 as a protein tyrosine phosphatase. *Molecular and biochemical parasitology* 148, 161-168.
- Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., Rosen, B.P., Mukhopadhyay, R., 2004, *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *The Journal of biological chemistry* 279, 37445-37451.
- Zhu, L.X., Zhang, Z.W., Wang, C., Yang, H.W., Jiang, D., Zhang, Q., Mitchelson, K., Cheng, J., 2007, Use of a DNA microarray for simultaneous detection of antibiotic resistance genes among staphylococcal clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* 45, 3514-3521.
- Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A., el-Hassan, I.M., el-Hassan, A.M., 2003, Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases* 3, 87-98.